

Contaminação química e microbiológica em lapas (*Patella* spp.) e mexilhão (*Mytilus* spp.)

José Rodrigues Caetano

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em **Engenharia
Alimentar**

Orientadores: Doutora Helena Maria Gomes Lourenço

Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato

Júri:

Presidente: Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Doutora Helena Maria Gomes Lourenço, Investigadora Auxiliar do Instituto Português do Mar e da Atmosfera, IPMA.

“In the great battles of life, the first step to victory is the desire to win”

-Mahatma Gandhi

Agradecimentos

Depois de realizado todo este trabalho, só me resta agradecer a todas as pessoas que me ajudaram a concluir esta etapa, bem como todo o apoio prestado.

Às minhas orientadoras e orientador, Doutora Helena Lourenço, Doutora Sónia Pedro e Doutor Miguel Mourato pelo grande apoio durante todo o estágio, pela paciência que tiveram ao longo deste trabalho, por estarem sempre presentes e disponíveis e ajudando-me a ultrapassar todas as dificuldades.

Às instituições, o Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA) e ao Instituto Superior de Agronomia, que proporcionaram as condições necessárias para que este trabalho fosse possível de ser realizado.

Agradeço a todas as pessoas da Divisão de Aquacultura e Valorização (DivAV) do IPMA que estiveram envolvidas neste trabalho. Em especial à Patrícia Oliveira, à Sara Costa, à Fernanda e à Margarida Muro, pela ajuda imprescindível durante todo o trabalho prático, pela amizade, pelo apoio prestado e por todos os conselhos.

A todos os meus amigos, pelo o apoio em todos os momentos que era preciso uma palavra de coragem para me direcionar pelo caminho certo.

À minha namorada, Sara, pelo o apoio durante estes anos todos que estamos juntos, pela paciência e pela boa disposição que me transmitia quando era preciso.

Por fim, às pessoas mais importantes da minha vida, os meus pais, os meus avós e a minha irmã, por todos os valores que me ensinaram desde pequeno, por tudo o que fizeram por mim durante estes anos todos, pelo apoio nesta reta final desta etapa importante da minha vida. Um enorme obrigado por tudo.

O meu sincero agradecimento a todos.

Resumo

A lapa é um molusco que pertence à Classe Gastropoda, sendo da família Patellidae e do género *Patella*. A lapa é univalve, por possuir apenas uma concha exterior de forma oval e ligeiramente cónica, que pode apresentar diversas cores e texturas dependendo da espécie e da zona de origem.

A realização desta dissertação teve como objetivo avaliar a microbiota e a contaminação por metais potencialmente tóxicos, em lapas (*Patella* spp), provenientes de três zonas costeiras de território nacional, em comparação com o mexilhão (*Mytilus* spp). Posteriormente foi avaliado o efeito do tratamento térmico nos principais contaminantes e a caracterização do valor nutricional nas lapas, sendo para isso estimado o efeito da variação temporal e sazonal.

Para este trabalho foram colhidas um total de 30 amostras (sendo cada amostra um conjunto de 20 indivíduos) de univalves e moluscos bivalves (sendo destas 15 de lapas e 15 de mexilhão), entre elas, 10 da zona norte (zona marcada pelo ponto de amostragem do IPMA como L1 – Litoral Viana), 10 da zona centro (zona marcada pelo ponto de amostragem do IPMA como L5a – Litoral Peniche – Cabo Raso) e 10 provenientes da zona sul (zona marcada pelo ponto de amostragem do IPMA como L7a – Litoral Aljezur – S. Vicente).

Neste estudo verificou-se que a lapa, a nível de contaminantes microbiológicos não apresenta contaminações superiores ao limite legal, enquanto que a nível dos contaminantes químicos apresenta um elemento (cádmio) que os teores encontrados são superiores ao limite legal. Comparando as duas espécies verifica-se diferenças entre os teores de contaminantes.

Relativamente à composição nutricional da lapa, verificou-se que esta apresenta uma quantidade de proteína e de cinza superior a outras espécies de moluscos, dependendo da época e da zona de captura.

Palavras-chave: lapa; *Patella* spp; *Mytilus edulis*; contaminantes microbiológicos e químicos; composição nutricional.

Abstract

Limpet is a mollusk that belongs to the Gastropoda class, being of the Patellidae family and of the genus *Patella*. The limpet is a univalve, as it has only an outer shell of oval and slightly conical shape, which can have different colors and textures depending on the species and the area of origin.

The objective of this dissertation was to evaluate the microbiota and the contamination by harmful metals in limpets (*Patella* spp), coming from three coastal zones of the national territory, compared to the mussel (*Mytilus* spp). Subsequently, the effect of heat treatment in main contaminants, and the characterization of the nutritional value in the limpets, being estimated for this the effect of the temporal and seasonal variation.

For this work a total of 30 samples (each sample being a set of 20 individuals) of univalves and bivalve clams (15 of limpets and 15 mussel) were collected, including 10 from the north zone (zone marked by IPMA sampling point as L1 – Litoral Viana), 10 from the central zone (zone marked by IPMA sampling point as L5a – Litoral Peniche – Cabo Raso) and 10 from the south zone (zone marked by IPMA sampling point as L7a – Litoral Aljezur – S. Vicente).

In this study it was found that the limpets, at the level of microbiological contaminants have no contamination above the legal limit, while at the level of chemical contaminants has an element (cadmium) with levels above the legal limit. Comparing the two species, there are differences between the levels of contaminants.

Regarding the nutritional composition of the limpet, it was found that it has a greater amount of protein and ash compared to other clam species, depending on the season and the area of capture.

Keywords: limpet; *Patella* spp; *Mytilus edulis*; microbiological and chemical contaminants; nutritional composition.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Lista de abreviaturas	viii
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	x
1. Objetivos	1
2. Revisão bibliográfica	1
2.1. Pesca e produção de moluscos	1
2.2. Consumo de moluscos	2
2.3. Caracterização da Lapa (<i>Patella</i> spp)	2
2.4. Caracterização do Mexilhão (<i>Mytilus</i> spp)	4
2.5. Composição nutricional	6
2.6. Principais contaminantes	6
2.7. Contaminantes microbiológicos	8
2.7.1. <i>Escherichia coli</i>	8
2.7.2. <i>Vibrio</i> spp	8
2.8. Contaminantes químicos	9
2.8.1. Mercúrio	9
2.8.2. Cádmio	10
2.8.3. Chumbo	10
2.8.4. Arsénio	11
3. Material e Métodos	12
3.1. Amostragem	12
3.2. Preparação de material, reagentes e meios de cultura	13
3.3. Preparação das amostras	13
3.4. Análises microbiológicas	14
3.4.1. Contagem de microrganismo viáveis totais	14
3.4.2. Quantificação de <i>Escherichia coli</i> e coliformes	14
3.4.3. Pesquisa e contagem de <i>Vibrio</i> spp	15
3.5. Análises de contaminantes químicos	16
3.5.1. Chumbo e Cádmio	16
3.5.2. Mercúrio	17

3.5.3.	Arsénio	18
3.6.	Composição nutricional	19
3.6.1.	Determinação da humidade	19
3.6.2.	Determinação da cinza total	20
3.6.3.	Determinação da gordura livre	21
3.6.4.	Determinação da proteína	22
3.6.5.	Determinação do glicogénio	22
3.6.6.	Determinação do fósforo	24
3.6.7.	Determinação do teor de elementos essenciais (Cu, Zn, Fe, Mg, Mn, Na, Cr e Ni) 25	
3.7.	Tratamento térmico	26
3.8.	Análise estatística	27
4.	Resultados e Discussão	28
4.1.	Dados biométricos	28
4.2.	Contaminantes microbiológicos	29
4.2.1.	Microrganismos totais	29
4.2.2.	Coliformes e <i>Escherichia coli</i>	30
4.2.3.	<i>Vibrio</i> spp	31
4.3.	Contaminantes químicos	32
4.3.1.	Mercúrio	32
4.3.2.	Cádmio	33
4.3.3.	Chumbo	34
4.3.4.	Arsénio	35
4.3.5.	Níquel	35
4.3.6.	Crómio	36
4.3.7.	Comparação entre as duas espécies	37
4.4.	Composição nutricional	39
4.5.	Tratamento térmico	41
5.	Conclusões	42
	Referências Bibliográficas	44
	Anexos	50

Lista de abreviaturas

ASPW – Água Peptonada Salina Alcalina

CHR – Chromocult Agar

EDTA – ácido etileno-diaminotetracético

FAO – *Food and Agriculture Organization*

INE – Instituto Nacional de Estatística

ISO – International Organization for Standardization

LD – Limite de deteção

LQ – Limite de quantificação

MMGB – Caldo de glutamato modificado com minerais

MRD – Maximum Recovery Diluent

MS – Matéria Seca

NMP - Número Mais Provável

NP – Norma Portuguesa

pf – peso fresco

ps – peso seco

rpm - rotações por minuto

TBX - Triptona Bilis X-glucuronido agar

TCBS - Tiosulfato de Citrato de Bilis e Sacarose agar

TSA – Tryptic Soy agar

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

Índice de Figuras

Figura 1 – Foto de uma lapa virada para baixo (A) e virada para cima (B)	3
Figura 2 - Diagrama da zona ventral de uma lapa; A – concha exterior; B – pé; C – manto; D – órgãos de visão; E – boca.....	4
Figura 3 – Habitat de lapas e mexilhão.	4
Figura 4 – Funções vitais do mexilhão (respiração e nutrição).	5
Figura 5 – Localização das zonas de produção; L1 – Litoral Viana; L5a – Litoral Peniche – Cabo Raso; L7a – Litoral Aljezur – S. Vicente.	12
Figura 6 – Contagens (médias \pm desvio padrão) de coliformes em log NMP/100g para lapas durante o estudo.	30
Figura 7 – Percentagem amostras positivas e negativas quanto à presença de <i>Vibrio</i> spp nas duas espécies ao longo do estudo.	38

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Dados biométricos (média \pm desvio padrão) das lapas analisadas ao longo do estudo.	28
Tabela 2 – Contagens (média \pm desvio padrão) de totais em log UFC/g para lapas, de acordo com a zona de produção e a estação do ano.	29
Tabela 3 – Contagens (média \pm desvio padrão) de E. coli em log NMP/100g para lapas, de acordo com a zona de produção e a estação do ano.	31
Tabela 4 – Teores de mercúrio (média \pm desvio padrão) em mg/kg para lapas, de acordo com a zona de produção e a estação do ano.	32
Tabela 5 – Teores de cádmio (média \pm desvio padrão) em mg/kg para lapas, de acordo com a zona de produção e a estação do ano.	33
Tabela 6 – Teores de chumbo (média \pm desvio padrão) em mg/kg para lapas, de acordo com a zona de produção e a estação do ano.	34
Tabela 7 – Teores de níquel (média \pm desvio padrão) em mg/kg para lapas, de acordo com a zona de produção e a estação do ano.	35
Tabela 8 – Teores de crómio (média \pm desvio padrão) em mg/kg para lapas, de acordo com a zona de produção e a estação do ano.	36
Tabela 9 – Teores de contaminantes (média \pm desvio padrão) das duas espécies estudadas.	37
Tabela 10 – Composição química (média \pm desvio padrão) em g/100 g da lapa.	39
Tabela 11 – Composição em elementos essenciais (média \pm desvio padrão) em mg/kg das lapas.	40
Tabela 12 - Teores dos principais contaminantes (média \pm desvio padrão) das lapas, antes e depois do tratamento térmico.	41

1. Objetivos

A realização desta dissertação teve como objetivo avaliar a microbiota e a contaminação por metais potencialmente tóxicos, em lapas (*Patella* spp), provenientes de três zonas costeiras de território nacional, em comparação com o mexilhão (*Mytilus* spp). Posteriormente será avaliado o efeito do tratamento térmico nos principais contaminantes nas lapas, uma vez que estas tradicionalmente não são consumidas em cru.

Foi também objetivo deste trabalho caracterizar o valor nutricional das lapas, sendo para isso estimado o efeito da variação temporal e sazonal.

Os dados apresentados nesta dissertação foram obtidos através de análises microbiológicas (*E.coli* e *Vibrio* spp) e químicas (metais potencialmente tóxicos e composição nutricional), efetuadas em amostras colhidas no âmbito do plano de monitorização de moluscos bivalves do Sistema Nacional de Monitorização de Moluscos Bivalves (SNMB).

2. Revisão bibliográfica

2.1. Pesca e produção de moluscos

A produção mundial de bivalves teve um grande aumento durante um determinado período de tempo, mais precisamente entre o ano de 1999 até 2006, passando de 10,7 milhões de toneladas para 14 milhões de toneladas. Este aumento pode ser explicado pelo melhoramento de transporte destes seres vivos, que permitiu a vários países poderem exportar o seu produto para o resto do mundo. Contudo, com esta expansão também vieram alguns desafios, para a defesa do consumidor, em relação à segurança dos bivalves, ou seja, houve a necessidade de se criarem níveis de aceitabilidade para tentar reduzir os riscos biológicos e químicos (FAO, 2008).

Em Portugal, a produção de moluscos bivalves podem ocorrer naturalmente em zonas costeiras ou estuarinas, ou podem ser produzidos em aquacultura. Esta última tem vindo a ganhar mais impacto porque a produção é controlada, ou seja, enquanto que a produção ao natural está condicionada ao meio ambiente que a rodeia, podendo ocorrer contaminações por toxinas provenientes de microalgas e por metais tóxicos, na aquacultura é possível controlar essas contaminações (Oliveira, 2012)

Segundo o INE (2019), no ano de 2017, a produção de moluscos foi cerca de 56,7 % da produção aquícola total, tendo assim um aumento de 12 % em 2017, sendo as amêijoas a espécie mais produzida, cerca de 3 887 toneladas, apresentando um aumento de produção de 4,6 %, de seguida encontra-se o mexilhão com cerca de 1 722 toneladas, apresentando um aumento de produção de 16,8 %. A produção que apresentou um aumento significativo comparativamente ao ano anterior foi a ostra, tendo aumentado 17 % em 2017.

2.2. Consumo de moluscos

Em Portugal, o consumo *per capita* de moluscos bivalves é inferior a 5 kg/pessoa/ano, no entanto a nível gastronómico apresentam grande interesse, pois encontram-se ligados à gastronomia tradicional de algumas regiões (Oliveira, 2012).

Em relação ao consumo de lapas, em Portugal continental não existem grandes antecedentes, mas nas regiões insulares, principalmente nas ilhas açorianas, estas apresentam um enorme peso na gastronomia, e, além de serem comercializadas vivas são exportadas em forma de conservas para países com emigrantes açorianos (Enes, 2015).

2.3. Caracterização da Lapa (*Patella* spp)

O filo Mollusca conta atualmente com 8 classes, destacando-se as classes Gastropoda e Bivalvia. A classe Gastropoda é uma das mais diversas nos animais, sendo um grupo com grande variedade estrutural e ecológica. Estão presentes em todos os habitats marinhos, desde o mar profundo até ao supralitoral. Os bivalves são o segundo grupo mais diversificado de moluscos; são encontrados desde as zonas mais profundas dos oceanos até à zona do intertidal, sendo importantes na maioria dos ecossistemas marinhos por serem organismos filtradores (EMEPC, 2016).

Segundo Rodrigues (2015) a lapa (Figura 1) é um molusco que pertence à Classe Gastropoda, sendo da família Patellidae e do género *Patella*. A lapa é univalve, por possuir apenas uma concha exterior (Letra A da Figura 2) de forma oval e ligeiramente cónica, que pode apresentar diversas cores e texturas dependendo da espécie e da zona de origem. Também está associada à colonização de outros seres vivos, como por exemplo as algas (Enes, 2015).

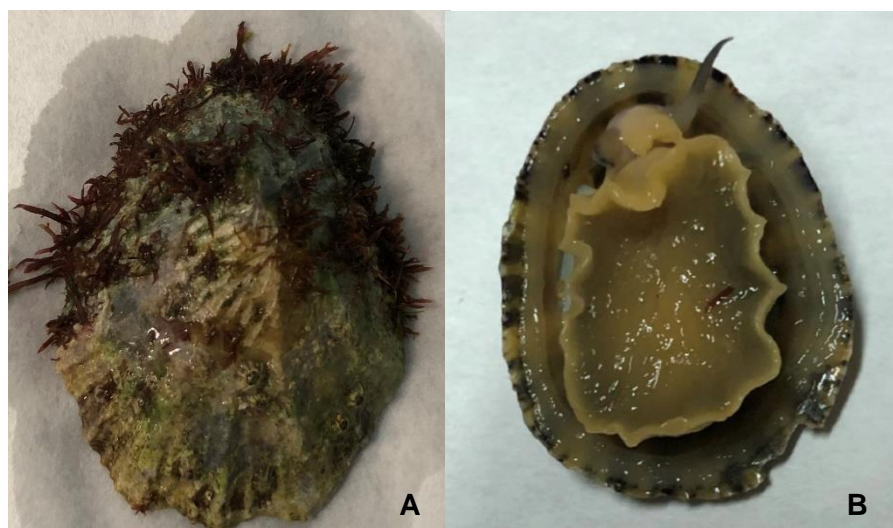


Figura 1 – Foto de uma lapa virada para baixo (A) e virada para cima (B)

Na zona ventral, a lapa (Figura 2), apresenta em grande evidência um pé (Letra B na Figura 2), sendo este constituído por uma massa ventral carnuda e alargada, que serve para o deslocamento e fixação da lapa ao substrato. Em volta do pé pode-se observar um manto (Letra C na Figura 2) que se estende até à extremidade da concha, que possui uma capacidade de retração e extensão da lapa. Adicionalmente, é possível observar uma cabeça bem diferenciada, onde se distinguem os órgãos de visão (Letra D da Figura 2) e uma boca (Letra E da Figura 2), a qual possui um órgão especializado - a rádula (semelhante a uma serrilha e que contém quitina).

São herbívoros raspadores, não filtrando água, alimentando-se essencialmente de algas, mas podem também consumir pequenos organismos como bactérias e larvas de outras espécies que se fixam no seu território (EMEPC, 2016; Henriques *et al*, 2017). Estes animais respiram por guelras que se encontram numa cavidade no manto (IPMA, 2018a; Enes, 2015).

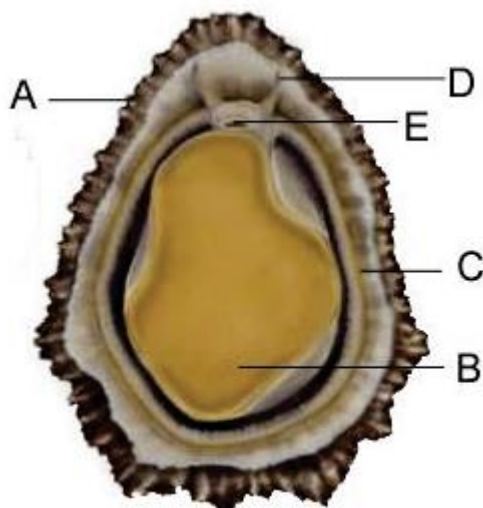


Figura 2 - Diagrama da zona ventral de uma lapa; A – concha exterior; B – pé; C – manto; D – órgãos de visão; E – boca. (Fonte: Enes, 2015).

Em Portugal as lapas encontram-se em abundância na costa rochosa, vivendo em conjunto com outros moluscos, por exemplo os mexilhões (Figura 3). Na costa portuguesa podemos encontrar pelo menos três espécies de lapas, sendo elas a *Patella depressa*, a *Patella aspera* e a *Patella vulgata* (Gaudêncio *et al*, 1986).



Figura 3 – Habitat de lapas e mexilhão.

2.4. Caracterização do Mexilhão (*Mytilus* spp)

Segundo Oliveira (2012), o mexilhão é um molusco que pertence à classe Bivalvia sendo da família Mytilidae e do género *Mytilus*. O mexilhão é um bivalve, pois possui uma concha sólida com simetria bilateral, de forma triangular. Apresenta na superfície lisa da concha um grande número de estrias de crescimento concêntricas e a charneira desprovida de dentes. A cor da parte externa da concha pode ser negra, azulada ou

violeta, enquanto que da parte interna é branca (Silva & Batista, 2008). As características morfológicas, como a da concha, são a base da taxonomia do mexilhão, podendo ser afetadas por fatores intrínsecos como extrínsecos, sendo a temperatura, a salinidade e a disponibilidade de alimento, alguns deles (Moreira, 2008).

Nos mexilhões, as principais funções vitais como a respiração, nutrição e a excreção são baseadas na filtração, como está demonstrado na Figura 4. Deste modo, os mexilhões são considerados filtradores e alimentam-se de partículas suspensas e fitoplâncton presente na água (Moreira, 2008; Cunha, 2012).

A taxa de crescimento do mexilhão está relacionada com a temperatura, uma vez que temperaturas elevadas fazem com que este se alimente mais provocando um aumento da taxa de crescimento, enquanto que a baixas temperaturas a taxa de crescimento diminui devido à menor disponibilidade de alimento (Oliveira, 2012).

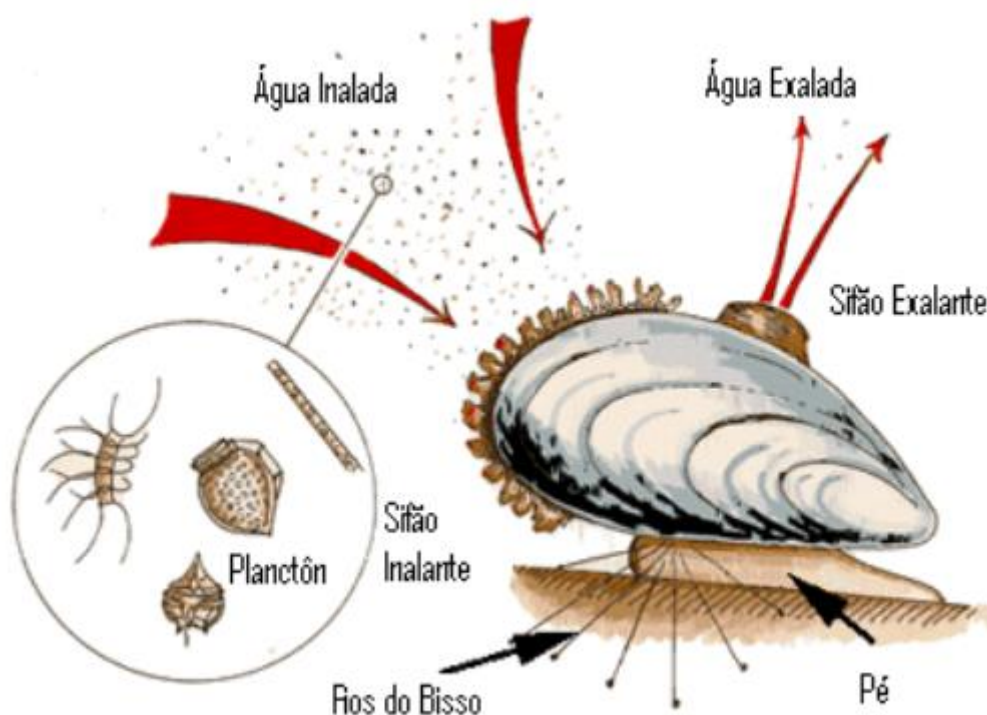


Figura 4 – Funções vitais do mexilhão (respiração e nutrição) (Fonte: Moreira, 2008).

Os mexilhões possuem a capacidade de se fixar nas rochas através dos fios do bisso, na zona intertidal, formando colônias pelas zonas costeiras e águas estuarinas, podendo sobreviver em zonas mais poluídas, como áreas portuárias (Oliveira, 2012). Quando sujeitos a condições ambientais adversas, o mexilhão tem a capacidade de

romper os fios do bisso e migrar, através da ação das marés, para locais mais adequados (Cunha, 2012).

2.5. Composição nutricional

O valor nutricional das lapas é influenciado por dois tipos de fatores, os externos, que são resultantes do meio onde vivem, tipo de dieta, época ou estação do ano e temperatura ambiente (Moraes *et al*, 2003), e os internos, que podem ser tamanho, sexo, idade e a maturação das gónadas (Brazão *et al*, 2003).

Comparativamente com outros moluscos as lapas são um molusco muito pouco estudado havendo assim pouca informação sobre o seu valor nutricional. Mas segundo Rodrigues (2015), as lapas apresentam lípidos com elevada importância nutricional para consumidor, ou seja, contém ácidos gordos polinsaturados do tipo $\omega 3$ que apresentam um efeito benéfico para os seres humanos uma vez que o seu organismo não é capaz de os sintetizar.

No entanto, os produtos da pesca apresentam uma grande importância na dieta humana uma vez que são uma fonte de nutrientes essenciais, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono e minerais. Os constituintes que aparecem em maiores quantidades são a água, as proteínas e os lípidos, enquanto que os hidratos de carbono aparecem em menores quantidades (Lourenço, 2011).

2.6. Principais contaminantes

A qualidade dos moluscos filtradores está relacionada com a qualidade das águas onde habitam, sendo contaminados quando expostos em meios que apresentam grande foco de contaminação, por exemplo águas provenientes de descargas urbanas ou de indústrias (Pedro & Silva, 2012).

Segundo Oliveira *et al* (2011), os moluscos bivalves apresentam dois tipos de contaminação, podendo ser uma contaminação biológica, ou seja, por parasitas, vírus, bactérias e biotoxinas, ou uma contaminação química, ou seja, mais especificamente por chumbo, cádmio, mercúrio e arsénio. Isto ocorre pelo facto de os moluscos bivalves terem a capacidade de bioacumula, sendo considerados indicadores da contaminação ambiental (Oliveira, 2018). A concentração destes contaminantes nos moluscos bivalves provoca reações químicas a nível celular, como reações de transferência eletrónica, formação de radicais livres oxigenados e alterações a nível das cadeias de DNA, resultando em fenómenos de mutagenicidade, genotoxicidade e carcinogenicidade

(Lourenço *et al*, 2012). O risco de intoxicação está relacionado com a ingestão de moluscos bivalves contaminados por biotoxinas, pesticidas e metais tóxicos e o risco de infeção está relacionado com a ingestão de moluscos bivalves contaminados por parasitas, vírus e bactérias (Oliveira *et la*, 2011).

De acordo com o Regulamento (UE) N.º 558/2010, e uma vez que os gastrópodes marinhos não são, em geral, animais que se alimentam por filtração, o risco de acumulação de microrganismos relacionados com a contaminação fecal pode ser considerado remoto. Além disso, não existe informação epidemiológica que estabeleça uma ligação entre as disposições para a classificação das zonas de produção e os riscos para a saúde pública associados a gastrópodes marinhos que não se alimentam por filtração. Por esta razão, esses gastrópodes marinhos foram excluídos das disposições relativas à classificação das zonas de produção estabelecidas no capítulo II da secção VII do anexo III do Regulamento (CE) N.º 853/2004, desde 29 de abril de 2004.

Perante estes tipos de contaminação, que colocam a saúde pública em risco, a Comissão Europeia teve a necessidade de estabelecer critérios de segurança, criando assim, o Regulamento (CE) N.º 2073/2005, que diz respeito aos critérios microbiológicos que os moluscos bivalves e afins têm que obedecer para serem colocados no mercado, sendo que os critérios microbiológicos para moluscos bivalves, equinodermes, tunicados e gastrópodes marinhos vivos foram revistos no Regulamento (UE) N.º 2015/2285, e o Regulamento (CE) N.º 1881/2006, que diz respeito aos teores máximos de certos contaminantes presentes em vários produtos da pesca.

Segundo o Regulamento (CE) N.º 2073/2005, o limite que foi estabelecido para a contaminação de moluscos bivalves vivos e equinodermes, tunicados e gastrópodes marinhos vivos por *E.coli* é uma amostra constituída por uma unidade, que é constituída por um mínimo de 10 indivíduos, o resultado da unidade não pode ultrapassar 230 NMP *E.coli*/100g de carne e de líquido intravalvar. Mas, com a revisão do regulamento o limite para a contaminação de moluscos bivalves e afins por *E.coli* foi alterado referindo que numa amostra constituída por cinco unidades, apenas uma dessas unidades pode apresentar um resultado superior a 230 NMP *E.coli*/100g, não podendo exceder os 700 NMP *E.coli*/100g, segundo o Regulamento (UE) N.º 2015/2285.

Para uma contaminação por *Vibrio* em moluscos bivalves, o Regulamento (CE) N.º 2073/2005 não apresenta nenhum critério microbiológico, mas realça a importância de estabelecer critérios para os vírus patogénicos presentes.

Segundo o Regulamento (CE) N.º 1881/2006, o teor máximo para a contaminação em univalves por contaminantes químicos é de 1,5 mg/kg de peso fresco para o chumbo

(Pb), de 1,0 mg/kg de peso fresco para o cádmio (Cd) e de 0,5 mg/kg de peso fresco para o mercúrio (Hg). Para o arsénio este regulamento não apresenta um teor máximo de contaminação para produtos da pesca, mas segundo a Food Standards Australia New Zealand (2019) esse limite máximo é de 1 mg/kg de peso fresco.

2.7. Contaminantes microbiológicos

2.7.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli é um bacilo gram-negativo, que pertence à família Enterobacteriaceae, é anaeróbio facultativo, é geralmente móvel, apresenta uma temperatura ótima de multiplicação perto dos 37 °C, sendo o seu habitat natural o trato intestinal do ser humano e animais de sangue quente (Pinto & Neves, 2010; Oliveira, 2018).

Grande parte das estirpes de *Escherichia coli* não apresentam virulência, no entanto existem algumas estirpes que são consideradas patogénicas, na medida que conseguem produzir toxinas, provocando assim doenças de maior ou menor severidade, dependendo do número de células ingerido (Oliveira, 2018).

Uma vez que esta bactéria pode estar presente no meio aquático, por um período de tempo longo, tem sido utilizada como um indicador de contaminações direta ou indireta de origem fecal (Pinto & Neves, 2010). Sendo considerada um indicador, pode indicar a presença de outros enteropatogénicos em alimentos e água (Oliveira, 2018).

2.7.2. *Vibrio* spp

O *Vibrio* é uma bactéria gram-negativa, que pertence à família das Vibrionaceae e que tem a capacidade de se mover através de flagelos. Esta bactéria é sensível a uma temperatura da água do mar inferior a 10 °C e a altas pressões, ou seja, este microrganismo não consegue habitar em águas muito profundas preferindo assim as águas costeiras (Pinto & Neves, 2010; Oliveira, 2011).

Existem pelo menos 12 espécies de *Vibrio* que são patogénicas para o homem, em particular as estirpes *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* e *Vibrio cholerae*, estando estas relacionadas com os casos de infeção em humanos após consumo de moluscos (Oliveira, 2011).

Estas estirpes de *Vibrio* são as que aparecem mais frequentemente nas águas costeiras, apresentando uma temperatura ótima de multiplicação entre os 20 °C e os 35

°C, podendo ir até uma temperatura máxima de 41 °C e até uma temperatura mínima de 10 °C. Acima dos 41 °C e abaixo dos 10 °C esta bactéria perde a sua capacidade de multiplicação, ou seja, é suscetível a temperaturas de cozimento e de congelação. Esta bactéria também consegue resistir a elevadas concentrações de NaCl, sendo a concentração de 2 % de NaCl a ótima de multiplicação. Outro fator que afeta a multiplicação desta bactéria é o pH, sendo que perde essa capacidade a pH ácidos (DePaola, 2014; FDA, 2012).

De acordo com DePaola (2014) o principal veículo de transmissão deste microrganismo para os humanos são os moluscos bivalves, pois estes são produzidos em zonas costeiras, que é o habitat natural deste microrganismo e quando é consumido sofre um ligeiro tratamento térmico ou é consumido em cru.

2.8. Contaminantes químicos

2.8.1. Mercúrio

O mercúrio (Hg) é um metal pesado que se encontra no estado líquido em condições de temperatura e pressão normais. A pressão de vapor deste elemento depende da temperatura, evaporando facilmente em determinadas condições ambientais (EPA, 1997).

A presença deste metal pesado na água deve-se a contaminações que tanto podem ser diretas (natural e industrial) como indiretas (poluição atmosférica global). O mercúrio encontra-se nas formas de sais inorgânicos, compostos orgânicos e elemento metálico, sendo que cada forma possui toxicidade e biodisponibilidade diferentes (Jaishankar *et al*, 2014). Os compostos orgânicos podem aparecer sob a forma de metilmercúrio, dimetilmercúrio, etilmercúrio, fenilmercúrio e metoxietilmercúrio, sendo o metilmercúrio o composto que tem maior importância quando falamos deste elemento relativamente à exposição humana (Oliveira, 2012).

Os compostos inorgânicos que são considerados menos prejudiciais à saúde humana são transformados, pelas bactérias aquáticas anaeróbicas, em metilmercúrio, composto altamente tóxico. A presença deste composto na água representa 1 a 10 % do mercúrio total, assim sendo o metilmercúrio acumula-se nos organismos dos animais marinhos devido à sua natureza lipofílica que facilita a penetração das células e à sua afinidade com certas proteínas, tendo uma taxa de excreção baixa. Desta forma, este composto consegue permanecer ao longo da cadeia trófica, sendo esta a principal forma de exposição deste elemento nos humanos (Oliveira, 2012; Jaishankar *et al*, 2014).

A exposição contínua ao metilmercúrio provoca principalmente danos neurológicos, em que o cérebro é o órgão alvo deste elemento, prejudicando assim o funcionamento natural do organismo humano. Alguns sintomas incluem dormência na boca, mãos e pés, dificuldade em engolir, fadiga, perda de visão e audição, podendo levar à morte (Oliveira, 2012).

2.8.2. Cádmio

O cádmio (Cd) é um metal pesado que faz parte da constituição da crosta terrestre, sendo o sétimo metal pesado mais tóxico segundo a classificação da ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (Jaishankar *et al*, 2014). Este é um subproduto da produção de zinco, ou seja, a principal fonte de poluição por cádmio é industrial. O zinco tem grande utilidade a nível industrial, podendo ser utilizado em revestimentos, em baterias alcalinas e como estabilizador de plásticos. A exposição ao cádmio pode ocorrer por inalação e/ou por ingestão, sendo a principal forma de exposição a ingestão. Os moluscos bivalves e univalves são dos principais veículos para a ingestão de cádmio, ou seja, o cádmio liga-se a uma proteína destas espécies de moluscos e acumula-se dentro destes organismos (Oliveira, 2012; Jaishankar *et al*, 2014).

Este metal, quando se apresenta em baixo teor, é suportado pelo organismo humano, mas quando ingerido em grandes quantidades leva a intoxicações agudas e crónicas (Jaishankar *et al*, 2014). As manifestações de toxicidade crónica, incluem doenças a nível pulmonar e a nível renal, onde a acumulação deste metal é cerca de 50 a 75 %, podendo chegar a provocar danos no sistema nervoso, imunológico e hepático. A toxicidade do cádmio é irreversível, pois ainda não existe nenhum tratamento aplicável clinicamente em humanos para a sua remoção do organismo, até à data (Oliveira, 2012).

2.8.3. Chumbo

O chumbo (Pb) é um metal que se encontra raramente na sua forma elementar podendo ser encontrado na maioria das vezes como sulfeto de chumbo (PbS). É encontrado amplamente pelo mundo, pois era muito utilizado na indústria por possuir propriedades como ser resistente à corrosão e ter um ponto de fusão baixo (Lourenço, 2011).

As principais formas de exposição deste metal resultam das emissões de combustível de escape dos automóveis, indústrias petrolíferas, tintas e corantes, cabos e tubulação. No caso dos moluscos bivalves e univalves, o chumbo é absorvido a partir

da água contaminada, proveniente de águas residuais e industriais, e estes animais apresentam geralmente maiores concentrações de chumbo do que os peixes. A absorção de chumbo depende do estado químico e físico do metal e do estado fisiológico e nutricional do organismo, ou seja, se o organismo apresentar um défice de macronutrientes e micronutrientes as taxas de absorção deste metal podem ser maiores (Oliveira, 2012).

A toxicidade do chumbo afeta várias partes do organismo humano sendo as principais o sistema nervoso, o sistema endócrino e a medula óssea. Os sintomas podem ser dores de cabeça e dor abdominal, mas se o caso for uma toxicidade crónica os sintomas podem agravar-se e conduzir à morte (Lourenço, 2011).

2.8.4. Arsénio

O arsénio (As) é considerado o vigésimo elemento mais abundante na Terra, sendo as suas formas inorgânicas, arsenito e arsenato, as formas consideradas mais tóxicas. A sua toxicidade depende do estado de oxidação e da forma da molécula, ou seja, quanto mais oxidada a molécula de arsénio se apresentar mais tóxica ela se torna. Mas se este elemento estiver na sua forma orgânica apresenta mais baixa toxicidade (Jaishankar *et al*, 2014; Lourenço, 2011).

Em ambiente natural o arsénio apresenta-se na sua forma orgânica, sendo metabolizado em arsénio inorgânico por bactérias, algas e fungos. A presença do arsénio inorgânico na água leva a que os seres vivos, por exemplo os moluscos bivalves, acumulem este elemento tóxico no seu organismo, que depois ao longo da cadeia alimentar chega até ao ser humano (Jaishankar *et al*, 2014).

A ingestão de arsénio inorgânico pode ocorrer através da alimentação, podendo ser através de ingestão de água ou através de alimentos, principalmente produtos de pesca como peixes e moluscos bivalves, ou através do ar. A exposição a este elemento em elevadas quantidades pode provocar o aparecimento de inúmeros efeitos tóxicos incluindo o aumento do risco de aparecimento de cancro (Lourenço, 2011).

3. Material e Métodos

3.1. Amostragem

Para este trabalho foram colhidas um total de 30 amostras (sendo cada amostra um conjunto de 20 indivíduos) de univalves e moluscos bivalves (sendo destas 15 de lapas e 15 de mexilhão), entre elas, 10 da zona norte (zona marcada pelo ponto de amostragem do IPMA como L1 – Litoral Viana), 10 da zona centro (zona marcada pelo ponto de amostragem do IPMA como L5a – Litoral Peniche – Cabo Raso) e 10 provenientes da zona sul (zona marcada pelo ponto de amostragem do IPMA como L7a – Litoral Aljezur – S. Vicente), como se pode verificar na Figura 5. Estas amostras foram colhidas por amostradores do IPMA e chegaram ao laboratório em condições de temperatura controlada de modo as análises serem realizadas nesse mesmo dia. As amostras foram recolhidas mensalmente nos diversos pontos de amostragem já referidos, entre fevereiro e junho de 2019.



Figura 5 – Localização das zonas de produção; L1 – Litoral Viana; L5a – Litoral Peniche – Cabo Raso; L7a – Litoral Aljezur – S. Vicente.

Em todas as amostras foram realizadas análises microbiológicas, sendo contabilizados os microrganismos viáveis totais, pesquisa e contagem de *Vibrio* spp e quantificação de *E. coli* e coliformes, e análises químicas referentes aos contaminantes químicos como o mercúrio, cádmio, chumbo e arsénio.

As amostras de lapa referentes aos meses de fevereiro e junho foram utilizadas para avaliação da composição nutricional.

3.2. Preparação de material, reagentes e meios de cultura

O material utilizado para este trabalho prático foi esterilizado e descontaminado previamente antes da realização das respectivas análises. As análises microbiológicas, foram realizadas em condições de assepsia, ou seja, foram realizadas dentro de uma câmara de fluxo laminar ou ao bico de Bunsen.

Os meios de cultura utilizados nas análises microbiológicas para o crescimento seletivo de microrganismos foram o Marine Agar (para os microrganismos viáveis totais), o tiosulfato de citrato de bilis e sacarose agar – TCBS (para a pesquisa/quantificação de *Vibrio*, após pré-enriquecimento em meio líquido) e o Triptona bilis X-glucuronido agar - TBX, e o Chromocult agar - CHR (para a quantificação de *E. coli* e coliformes, após pré-enriquecimento em meio líquido). Foram também utilizados meios de cultura de pré-enriquecimento, sendo eles a água peptonada salina alcalina - ASPW (para o ensaio de *Vibrio*), e o caldo de glutamato modificado com minerais - MMGB (para os ensaios de *E. coli* e coliformes). O meio de cultura TSA foi utilizado para a seleção de certas colônias de *Vibrio*, que eram suspeitas de serem típicas, para a realização dos testes de confirmação. As diluições decimais sucessivas foram efetuadas em *maximum recovery diluent* – MRD.

Em relação às análises químicas, o material sofreu uma descontaminação, ou seja, esteve durante 24 - 48 horas em ácido nítrico a 20 % (v/v) para que não ocorram contaminações entre amostras.

Todos os reagentes que foram utilizados para as análises químicas eram de qualidade analítica. A água utilizada na preparação das soluções era ultrapura, retirada do sistema Mili-Q (Integral 3, Merck Milipore). Os aparelhos utilizados nas restantes determinações foram calibrados e são certificados.

3.3. Preparação das amostras

Para as análises microbiológicas, procedeu-se à preparação das amostras segundo a Norma ISO 6887-3 (2017). Perante esta Norma deve-se ter em conta o ambiente de trabalho sempre asséptico e o material esterilizado, para que não ocorram

contaminações cruzadas com outras amostras. Para a análise microbiológica de moluscos bivalves vivos, no caso dos mexilhões, foram utilizados pelo menos 10 indivíduos inteiros e fechados, correspondendo a pelo menos 50 g de carne e líquido intervalvar. Estes indivíduos foram primeiramente lavados na parte exterior, para que sejam retiradas algumas areias ou algas que venham agarradas a eles. Depois desta lavagem, os indivíduos foram secos com papel absorvente e abertos em condições de assépsia, sendo recolhida a carne e o líquido intervalvar para um recipiente esterilizado. Para a análise microbiológica de gastrópodes marinhos vivos, no caso das lapas, foram utilizados entre 10 a 20 indivíduos, correspondendo a pelo menos 50 g do corpo do animal. Primeiramente foram lavados na parte exterior da concha, para retirar areias e algas agarradas, sendo depois colocados num tabuleiro esterilizado. De seguida foram separados o corpo do animal da concha, sendo o corpo colocado num recipiente esterilizado para que seja reduzido em pequenos pedaços.

Para as análises químicas depois de ter separado o corpo do animal e de ter escorrido o líquido intervalvar, no caso dos mexilhões, as amostras foram homogeneizadas no *polytron* (Kinematica AG, PT- MR 3100 D) e guardadas em frascos de plástico, sendo congeladas a -20 °C.

3.4. Análises microbiológicas

3.4.1. Contagem de microrganismo viáveis totais

Para realização da contagem de microrganismos viáveis totais, utilizou-se o procedimento da Norma ISO 4833-2 (2013). Segundo esta norma, retirou-se 0,1 mL da suspensão inicial e de cada diluição sucessiva preparada para uma placa de Petri com Marine Agar, o inócuo é espalhado por sementeira à superfície com semeador estéril. As placas deste meio foram incubadas a 30 °C durante 72 horas.

Depois de decorrer esse período de tempo procedeu-se à contagem, sendo os valores obtidos expressos em log de unidades formadoras de colónias por grama (log UFC/g).

3.4.2. Quantificação de *Escherichia coli* e coliformes

Para a realização da quantificação de *Escherichia coli* e coliformes, utilizou-se o procedimento de acordo com a Norma ISO 16649-3 (2015).

Para a quantificação de *Escherichia coli* e coliformes, retirou-se 10 mL da suspensão inicial (10^{-1}) para uma série de cinco tubos com o meio de cultura MMGB de concentração dupla, e 1 mL da mesma suspensão inicial (10^{-1}) para uma série de cinco tubos com o meio de cultura MMGB de concentração simples, de seguida prepara-se num tubo com 9 mL de MRD uma diluição decimal (10^{-2}) desta suspensão inicial (10^{-1}) e retira-se 1 mL dessa diluição decimal para uma série de cinco tubos de MMGB de concentração simples. Estas três séries de cinco tubos de semeados vão a incubar em banho de água a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 2 horas. Decorrido este tempo serão retirados os tubos em que não exista a produção de ácido, isto é, a tonalidade do meio de cultura MMGB inicialmente é lilás e passa a amarelo com a produção de ácido, e os tubos que apresentam tonalidade amarela são considerados suspeitos. Estes tubos suspeitos foram repicados para placas de TBX e CHR com uma ansa de 10 μL . Depois de repicados as placas de TBX vão a incubar numa estufa a $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 21 ± 3 horas, e as placas de CHR foram a incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 21 ± 3 horas. As colónias típicas de *Escherichia coli* apresentam características de serem azuis/esverdeadas nas placas de TBX e roxas nas placas de CHR. Os coliformes só aparecem nas placas de CHR como uma coloração rosa, pois o meio de cultura TBX é um meio que é seletivo só para a estirpes de *Escherichia coli*.

Para a realização dos cálculos, contam-se nas três séries de cinco tubos com resultados positivos, e a partir de umas Tabelas de número mais provável (NMP) apresentam-se os resultados finais em log NMP por 100 g.

3.4.3. Pesquisa e contagem de *Vibrio* spp

Para a realização da pesquisa e contagem de *Vibrio* utilizou-se uma adaptação do procedimento descrito na Norma ISO 21872-1 (2017).

Para a pesquisa de *Vibrio*, recolheu-se 25 g de cada amostra, de mexilhão e lapa, e homogeneizou-se em 225 mL de ASPW, num frasco de vidro, para o pré-enriquecimento e incubou-se a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Em seguida, com uma ansa estéril mergulha-se no frasco onde se encontra a cultura e semeia-se por esgotamento numa placa com o meio TCBS, levando-se a placa a incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 3 horas. As colónias de *Vibrio* apresentam características de serem amarelas ou verdes dependendo da estirpe. Destas colónias típicas são recolhidas uma de cada cor para a realização dos testes de confirmação, a prova da oxidação e o teste de gram. Antes da realização desses testes as colónias escolhidas são repicadas para uma placa como o meio de cultura TSA e vai

a incubar a 37 °C durante 24 ± 3 horas, para que o teste de confirmação seja realização com colónias com menos de 24 horas. Para o teste da oxidase, retira-se com uma ansa estéril um bocado da colónia semeada na placa de TSA e risca-se num papel de filtro, que contém um reagente de oxidase, se o papel de filtro ficar com a cor violeta/roxo escuro em 10 segundos o teste é positivo. Para o teste da viscosidade do hidróxido de potássio, retira-se um bocado de colónia presente na placa de TSA com uma ansa estéril e passa-se a ansa na superfície de uma lâmina ou de uma placa de petri, contendo uma gota de KOH, o qual vai romper as células e libertar o DNA. Se a gota de KOH ficar com uma estrutura pegajosa é porque aquela colónia é gram-negativa, se a gota ficar líquida a colónia é gram-positiva.

Para a contagem de *Vibrio*, retirou-se da suspensão inicial preparada para a pesquisa de *Vibrio* que esteve a incubar a 37 °C durante 1 hora, 0,1 mL e duas vezes 0,5 mL para as respetivas placas de Petri com o meio de cultura TCBS, sendo estas incubadas a 37 °C durante 24 ± 3 horas. Decorrido esse tempo foram contadas as colónias verdes e amarelas que são consideradas colónias típicas de *Vibrio*, após teste de confirmação, sendo os valores obtidos expressos em unidades formadoras de colónias por grama (UFC/g).

3.5. Análises de contaminantes químicos

3.5.1. Chumbo e Cádmio

Para a determinação de chumbo e cádmio seguiu-se a norma europeia NP EN 14084 (CEN, 2003), que tem como princípio a digestão ácida da amostra em micro-ondas, com ácido nítrico e peróxido de hidrogénio, para a destruição da matéria orgânica, de modo a disponibilizar os analitos para a análise no espectrofotómetro de absorção atómica por forno de grafite.

Para esta análise pesou-se cerca de 1 g de amostra para os vasos de digestão, sendo adicionado 4 mL de ácido nítrico suprapuro a 65 % (Merck) e 1 mL de peróxido de hidrogénio a 30 % (Merck) em cada vaso. De seguida os vasos foram selados e colocados no micro-ondas (CEM, MARS 5), com um programa de 35 minutos, nos primeiros 20 minutos ocorre o aquecimento em rampa até à temperatura de 210 °C e um aumento da pressão até 350 psi, ficando a essa temperatura durante os 15 minutos até à digestão completa da amostra. Juntamente com as amostras, foram colocados um branco e um padrão, material de referência certificado DORM-4 (fish protein), do “National Research Council of Canada”. Após a digestão das amostras, transferiu-se o

conteúdo de cada vaso para um balão volumétrico de 25 mL, sendo a tampa e o vaso passados por água ultrapura para dentro do balão até perfazer o volume do mesmo. As amostras de seguida foram colocadas em *vials*, mais os brancos de digestão, padrões de chumbo e cádmio de concentração de 20 µL/mL e 1 µL/mL, respetivamente, e a solução de ácido nítrico a 1 %, sendo dispostas num carrossel do auto-mostrador, assim como as soluções de modificadores, hidrogenofosfato de amónio monobásico para o chumbo e o ácido ortofosfórico para o cádmio. De seguida, efetua-se as leituras no espectrofotómetro de absorção atómica com forno de grafite (Varian, SpectrAA 240 Z). Para determinar a concentração de chumbo e cádmio das amostras foi necessário elaborar curvas de calibração com as concentrações de 2, 4, 6, 8, 12, 16 µg/L para o chumbo e de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 µg/L para o cádmio.

A análise foi feita em duplicado e o resultado foi obtido pela média das duas determinações, arredondado às centésimas e expresso em mg/kg de pf. Os limites de deteção e quantificação para este método são de 0,02 mg/kg e 0,06 mg/kg para o chumbo e de 0,002 mg/kg e 0,006 mg/kg para o cádmio, respetivamente.

O teor de chumbo e cádmio, em mg/kg de pf, é dado pela Equação 1:

$$(1) \text{ Teor de chumbo/cádmio} = \frac{(a - b) \times V}{m}$$

Em que:

a- Concentração de amostra, dada pela leitura da curva de calibração, em mg/L.

b- Média das concentrações dos brancos, dada pelo aparelho, em mg/L.

V- Volume da amostra, em mL.

m- Massa da toma para a análise, em g.

3.5.2. Mercúrio

Para a determinação do mercúrio seguiu-se o método descrito na norma americana EPA 7473 da *Environment Protection Agency* (EPA, 2007), que tem como princípio a decomposição da amostra por aquecimento, libertando o mercúrio, ocorrendo oxidação e arrastamento por fluxo de oxigénio, dos produtos da decomposição. De seguida, os halogénios, óxidos de azoto e enxofre são retidos e existe a formação de uma amálgama que retém o mercúrio, que depois de aquecido é libertado em forma de vapor. Para finalizar, um fluxo de oxigénio transporta o mercúrio até à célula de absorção do

espectrofotômetro, sendo assim quantificado através da leitura da absorvância no comprimento de onda de 253,7 nm.

Para esta determinação foram pesados cerca de 20 mg de cada amostra para uma barquinha e adicionado óxido de alumínio. De seguida colocou-se a barquinha no equipamento e efetuou-se a leitura por absorção atômica no analisador de mercúrio (LECO, AMA 254). No final da leitura, retirou-se a barquinha e limpou-se entre cada leitura. Para cada sessão de utilização do equipamento efetuou-se sempre um ensaio branco, dois ensaios de padrões de verificação da curva de calibração e uma leitura de um material de referência certificado (DORM-4).

A curva de calibração utilizada foi a que estava introduzida no *software* do analisador (0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 10,0; 20,0; 30,0; 36,0 ng de mercúrio).

Esta análise foi feita em duplicado e o resultado foi obtido pela média das duas determinações, arredondado às milésimas e/ou às centésimas e expresso em mg/kg de pf. Os limites de deteção e quantificação para este método nas condições descritas são de 0,004 mg/kg e 0,011 mg/kg, respetivamente.

O teor de mercúrio, em mg/kg de pf, é dado pela Equação 2:

$$(2) \text{ Teor de mercúrio} = \frac{A}{m}$$

Em que:

A-Leitura dada pelo analisado, em ng.

m- Massa da toma para análise, em mg.

3.5.3. Arsénio

Para a determinação do arsénio seguiu-se o método descrito por Moreira *et al* (2015), que tem como princípio a quantificação de arsénio através da digestão ácida da amostra em micro-ondas, ácido nítrico e peróxido de hidrogénio, para a destruição da matéria orgânica, de modo a disponibilizar os analitos para a análise por espectrofotometria de emissão atômica acoplada de plasma induzido (Thermo Scientific, iCap 7000 series).

Para a determinação do arsénio, pesou-se 1 g de amostra para os vasos de digestão, sendo adicionado 4 mL de ácido nítrico suprapuro a 65 % (Merck) e 1 mL de peróxido de hidrogénio a 30 % (Merck) em cada vaso e foram selados e colocados no

micro-ondas, seguindo o procedimento de digestão como no cádmio e chumbo. Após a digestão das amostras, transferiu-se o conteúdo de cada vaso para um balão volumétrico de 25 mL, sendo a tampa e o vaso passados por água ultrapura para dentro do balão até perfazer o volume do mesmo. As amostras de seguida foram colocadas em tubos, mais os brancos de digestão e padrões de arsénio, que é preparado a partir de uma solução multielementar de concentração conhecida (SCP Science, PlasmaQual S22).

Para determinar a concentração de arsénio das amostras foi necessário elaborar uma curva de calibração adequada à quantidade de amostras que se ia medir, sendo utilizadas curvas cujo o $R^2 > 0,98$. As leituras das amostras foram sempre intercaladas com as leituras de padrões de concentração conhecida.

Esta análise foi feita em duplicado e o resultado foi obtido pela média das duas determinações, arredondado às milésimas e/ou às centésimas e expresso em mg/kg MS de parte edível.

3.6. Composição nutricional

3.6.1. Determinação da humidade

A determinação deste parâmetro baseou-se na norma portuguesa NP 2282 (IPQ, 2009a), que tem como princípio a secagem da amostra em estufa a 105 ± 2 °C até obter uma massa constante.

Para esta determinação foram utilizados cadinhos que previamente foram colocados na estufa (Memmert, ULE 500) a 105 ± 2 °C durante 30 minutos. Decorrido esse tempo foram retirados e colocados num exsiccador para arrefecer durante 30 minutos e de seguida foram pesados numa balança analítica de precisão. Depois dos cadinhos pesados procedeu-se à pesagem da 5 g de amostra para cada cadinho, sendo posteriormente colocados na estufa durante a noite. Ao final desse tempo, os cadinhos foram retirados da estufa e colocados a arrefecer num exsiccador durante 30 minutos, sendo depois pesados.

A análise foi feita em duplicado e o resultado foi obtido pelas médias das duas determinações, arredondado às décimas e expresso em g/100 g de pf.

O teor de humidade, em g/100 g de pf, é dado pela Equação 3:

$$(3) \text{ Teor de humidade} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100$$

Em que:

m₁- massa do cadinho, em g.

m₂- massa do cadinho e toma para análise, em g.

m₃- massa do cadinho e toma para análise após secagem, em g.

3.6.2. Determinação da cinza total

A determinação deste parâmetro baseou-se na norma portuguesa NP 2032 (IPQ, 2009b), que tem como princípio a carbonização e incineração da amostra em mufla a uma temperatura de 500 ± 25 °C.

Para esta determinação foram pesados cerca de 5 g de amostra para um cadinho. De seguida colocou-se o cadinho com a amostra numa estufa, a 105 ± 2 °C durante uma noite, para secar a amostra. Decorrido esse tempo, o cadinho foi colocado na mufla (Heraeus, MR 170 E), sendo aumentado gradualmente a temperatura até atingir 500 ± 25 °C, permanecendo assim cerca de 16 horas. Ao final desse tempo, o cadinho que continha a cinza da amostra, foi retirado da mufla e colocado num exsiccador para arrefecer e ser pesado. Após a pesagem o cadinho regressou à mufla para voltar a ser incinerado, durante 30 minutos, e ao fim desse tempo voltou ao exsiccador para arrefecer e ser pesado. Este procedimento foi repetido até obter-se duas pesagens sucessivas, em que a diferença entre si não fosse mais do que 1 mg.

A análise foi feita em duplicado e o resultado foi obtido pela média das duas determinações, arredondado às centésimas e expresso em g/100 g de pf. Os limites de deteção e quantificação para este método nas condições descritas são de 0,16 g/100 g e 0,38 g/100 g, respetivamente.

O teor de cinza total, em g/100 g de pf, é dado pela Equação 4:

$$(4) \text{ Teor de cinza total} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \times 100$$

Em que:

m1- Massa do cadinho vazio, em g.

m2- Massa do cadinho e toma para análise, em g.

m3- Massa do cadinho e do resíduo, em g.

3.6.3. Determinação da gordura livre

A determinação deste parâmetro baseou-se na norma portuguesa NP 1972 (IPQ,2009c), que tem por base a extração da matéria gorda da amostra, recorrendo a um solvente orgânico.

Para esta determinação foram pesados cerca de 10 g de amostra, em que se adicionou uma quantidade idêntica de sulfato de sódio anidro (Merck). Homogeneizou-se esta mistura, sendo no final transferida para um cartucho de extração, em papel de filtro. De seguida, colocou-se o cartucho no extrator. Num balão de fundo achatado, previamente seco em estufa a 105 ± 2 °C durante 30 minutos, arrefecido no exsiccador e pesado, colocou-se éter etílico (Panreac). O extrator que continha o cartucho foi colocado no balão e encheu-se com solvente de extração até o cartucho ficar submerso totalmente. Seguidamente, este conjunto foi colocado em cima das placas de aquecimento (SBS, PC 6L), sendo ligadas e aumentado a temperatura destas gradualmente. Decorridas as 7 horas de extração, o solvente foi retirado por aquecimento obtendo-se o balão com o extrato de gordura. Em seguida, o balão com o extrato de gordura foi colocado na estufa, durante 30 minutos, para secar, sendo posteriormente arrefecido no exsiccador e pesado. Estas etapas repetiram-se até obter um peso constante, ou seja, até que não houvesse diferenças entre duas pesagens sucessivas de 0,1 %.

A análise foi feita em duplicado e o resultado foi obtido pela média das duas determinações, arredondado às décimas e expresso em g/100 g de pf. Os limites de deteção e quantificação para este método nas condições descritas são de 0,1 g/100 g e 0,3 g/100 g, respetivamente.

O teor de matéria gorda livre, em g/100 g de pf, é dado pela Equação 5:

$$(5) \text{ Teor de gordura} = (m3 - m2) \times \frac{100}{m1}$$

Em que:

m1- massa da toma da amostra, em g.

m2- massa do balão de extração, em g.

m3- massa do balão de extração com o extrato de gordura após secagem.

3.6.4. Determinação da proteína

A determinação deste parâmetro baseou-se no método de Dumas (Kirsten and Hesselius, 1983) num aparelho de análise de azoto (LECO, FP 528). Este método apresenta como princípio a combustão da amostra na presença de O₂ num tubo de combustão. Desta combustão irá resultar a libertação de dióxido de carbono, água e azoto, sendo que o dióxido de carbono e a água são removidos por absorção em colunas e o teor de azoto é medido por condutividade térmica.

Para esta determinação foram pesados cerca 250 mg de amostra para uma folha de estanho, sendo fechada e colocada num carrossel do aparelho previamente programado. Para além das amostras, pesou-se um padrão de referência (EDTA – ácido diaminotetracético (Leco)), este padrão apresenta uma concentração já conhecida de azoto, 9,56 ± 0.03 g/100 g. As leituras foram efetuadas de acordo com as instruções do aparelho (LECO, FP 528).

O teor de proteína foi dado pelo *software*, sendo calculado multiplicando o resultado obtido do teor de azoto por um fator convencional de conversão de 6,25 (Jones, 1941).

A análise foi feita em duplicado e o resultado foi obtido pela média das duas determinações, arredondado às décimas e expresso em g/100 g de pf.

3.6.5. Determinação do glicogénio

Para a realização desta determinação foi necessário a preparação de alguns reagentes como da antrona (Merck), que é preparada com ácido sulfúrico concentrado 95-97 % (m/m) (Fluka), do hidróxido de potássio (Panreac), de uma solução saturada de sulfato de sódio (Merck) e uma solução padrão de glicogénio (Sigma).

A determinação deste parâmetro baseou-se no método de Viles and Silverman (1949). Este método tem por base a digestão do tecido com hidróxido de potássio, seguido da precipitação do glicogénio, sendo hidrolisado no final com ácido sulfúrico. Nesta hidrólise, as ligações glicosídicas formam um composto a partir da desidratação dos açúcares simples, ou seja, da glicose. Esta condensa a antrona dando origem a um composto azul que é quantificado por espectrofotometria de absorção molecular.

Para a determinação do teor de glicogénio das amostras efetuou-se uma liofilização destas. Primeiramente, foi colocado uma parte da massa das amostras numa placa de Petri e congelada numa arca a -80 °C, sendo depois colocada a placa num liofilizador (Hetp, LL3000), durante 24 horas, como o objetivo de remover a água da amostra por sublimação, ficando apenas o resíduo seco da amostra. De seguida, a amostra liofilizada foi homogeneizada a pó por uma picadora (Grinder, HM 100).

Desta amostra em pó pesou-se cerca de 25 mg para um tubo, onde se adicionou 15 mL de solução de hidróxido de potássio a 33 %. De seguida, os tubos foram tapados e colocados num banho de água (Memmert) em ebulição durante 15 minutos, sendo agitados 2 vezes no decorrer desse tempo. Depois de arrefecidos retirou-se 0,5 mL de cada tubo para um tubo novo e adicionou-se 50 µL da solução saturada de sulfato de sódio anidro e 2 mL de etanol. Os tubos foram agitados num *vortex* (Snijders, 34524) e de seguida foram introduzidos num banho de gelo (4 °C) durante 30 minutos, ate aparecer um precipitado. Centrifugaram-se (Eppendorf, 5702R) os tubos durante 10 minutos a 3000 rpm, decantou-se o sobrenadante e inverteu-se os tubos sobre papel absorvente. Dissolveu-se o precipitado em 0,4 mL de água destilada em agitação no *vortex*. De seguida, juntou-se 3 mL de antrona aos tubos e leva-se outra vez ao *vortex*. Colocou-se os tubos num banho de água a 90°C durante 20 minutos com agitação a meio do tempo. No final desse tempo, os tubos foram retirados do banho e deixados a arrefecer à temperatura ambiente ou em água. Depois dos tubos arrefecidos levam-se a ler no espectrofotómetro (absorção UV/Vis de duplo feixe (UNICAM, helios α) a 620 nm contra o branco. Preparou-se uma curva de calibração usando o glicogénio como padrão com concentrações de 25, 50, 100, 200, 300 µg/mL.

A análise foi feita em duplicado e o resultado foi dado pela média das duas determinações, arredondado às centésimas e expresso em g/100 g de pf.

O teor de de glicogénio, em g/100 g de pf, é dado pela Equação 6:

$$(6) \text{ Teor de glicogénio} = \frac{C \times 15 \times 0,4 \times 100}{0,5 \times 1000 \times m} \times \frac{100}{100 - H}$$

Em que:

C- Concentração da solução obtida através da curva de calibração, em µg/mL.

m- Massa da toma para análise, em mg.

H- Teor de humidade, em g/100g.

3.6.6. Determinação do fósforo

A determinação deste parâmetro baseou-se na norma ISO 13730 (1996), tendo por base a secagem da amostra, incineração do resíduo a 500 ± 25 °C, em mufla, hidrólise ácida da cinza com ácido nítrico, filtração e diluição, havendo a formação de um composto amarelo depois da adição de um reagente colorimétrico, que é composto por uma mistura monovanadato de amónio e heptamolibdato de amónio, sendo feita a leitura em espectrofotómetro de absorção ultravioleta-visível a 430 nm.

Para a determinação do fósforo, pesou-se cerca de 5 g de amostra para um cadinho, sendo colocado na mufla para incineração, seguindo o procedimento da cinza total. Decorrido este passo, colocou-se ácido nítrico a 33 % (v/v) no cadinho que contém a cinza, sendo levado a uma placa de aquecimento (Stuart, CR300), permanecendo nesta durante 8 minutos em ebulição. No final desse tempo, deixou-se o cadinho arrefecer e filtrou-se para um balão de 100 mL, perfazendo-se com água ultrapura. De seguida, pipetou-se 500 µL do filtrado para um tubo de 5 mL e adicionou-se 1500 µL do reagente colorimétrico e perpez-se o volume a 5 mL com água ultrapura. Deixou-se arrefecer os tubos e de seguida procede-se à leitura dos mesmo num espectrofotómetro (absorção UV/Vis de duplo feixe (UNICAM, heλios α) a 430 nm. Para a determinação da concentração deste parâmetro foi necessário elaborar uma curva de calibração com soluções padrão com concentrações de 10, 20, 30, 40, 50 µg de P₂O₅/mL.

Esta análise foi feita em duplicado e o resultado foi dado pela média das duas determinações, arredondado às unidades e expresso em g P/kg de pf. O limite de deteção para este método nas condições descritas é de 0,01 mg/kg.

O teor de fósforo, em mg/kg de pf, é dado pela Equação 7:

$$(7) \text{ Teor de fósforo} = \frac{C \times 1000}{m} \times \frac{61,9}{141,9}$$

Em que:

C- Concentração da solução obtida na curva de calibração, em µg de de P₂O₅/mL.

m- Massa da toma para análise, em g.

3.6.7. Determinação do teor de elementos essenciais (Cu, Zn, Fe, Mg, Mn, Na, Cr e Ni)

A determinação do teor de Cu, Zn, Fe, Mg, Mn, K, Na, Cr e Ni baseou-se na metodologia proposta por Jorhem (2000), que apresenta como princípio a incineração da amostra, seguidamente de solubilização em ácido nítrico com leitura por espectrometria de absorção atômica de chama.

Para a determinação do teor de Cr e Ni pesou-se cerca de 10 g para um cadinho de porcelana, enquanto que para a determinação do teor de Cu, Zn, Fe, Mg, Mn, K e Na pesou-se cerca de 5 g para um cadinho de quartzo, sendo depois secos em estufa a 105 ± 2 °C durante uma noite. Seguidamente, os cadinhos foram colocados na mufla, sendo este procedimento igual ao já descrito anteriormente para o teor de cinza total. Depois de arrefecer à temperatura ambiente, dentro de um exsiccador, humedeceram-se os cadinhos, que continham a cinza, com ácido nítrico 65 % ultrapuro, sendo colocados numa placa de aquecimento (Stuart, CR300) para que ocorra o branqueamento da cinza. Os cadinhos voltaram novamente à mufla a 400 °C durante 30 minutos. Decorrido esse tempo, adicionou-se 5 mL de ácido nítrico a 15 % a quente, para dissolver a cinza e transferiu-se para um balão de 10 mL, utilizando um funil com um papel de filtro, perfazendo-se o volume com água ultrapura no caso da determinação de Cr e Ni, enquanto que na determinação dos restantes metais foram adicionados 12 mL de ácido nítrico a 15 % a quente, transferindo-se para um balão de 25 mL, perfazendo-se com água ultrapura. Preparou-se uma curva de calibração para cada elemento com concentrações de 0,3; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L para o Cu, 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 1,0 mg/L para o Zn, 0,5; 1,0; 2,0; 2,5; 5,0 mg/L para o Fe, 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/L para o Na, 0,10; 0,15; 0,20; 0,30; 0,40 mg/L para o Mg, 0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 1,2 mg/L para o K, 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 1,5 mg/L para o Mn, 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 2,5 mg/L para o Cr e 0,05; 0,08; 0,1; 0,5; 1,0 mg/L para o Ni.

As soluções obtidas para as amostras, os padrões e o branco foram lidas num espectrofotómetro de absorção atómica (Varian, Spectr AA 55B) nos respetivos comprimentos de onda. As lâmpadas utilizadas para as leituras destes elementos são de cátodo oco.

Esta análise foi feita em duplicado e os resultados foram dados pela média das duas determinações, e dependendo das concentrações apresentaram-se os resultados arredondados às centésimas, no caso do Cr, Ni e Cu, às décimas, no caso do Zn, Mn e Fe, e às unidades, no caso do Mg, K e Na, sendo expresso o resultado final em mg/kg de pf. Os limites de deteção para este método nas condições descritas são de 0,09 mg/kg para o Cr e Na, 0,02 para o Ni, Cu e Mg, 0,01 mg/kg para o Mn e K e 0,32 mg/kg para o Fe.

O teor de elementos essenciais, em mg/kg de pf, é dado pela Equação 8:

$$(8) \text{ Teor de elementos essenciais} = \frac{A \times V}{m}$$

Em que:

A- Concentração da amostra, dada pela curva de calibração, em µg/mL

V- Volume da dissolução para análise, em mL

m- Massa da toma para análise, em g

3.7. Tratamento térmico

Para a realização deste ensaio utilizou-se uma placa de aquecimento (Stuart, CR300) e um grelhador. Agrupou-se três conjuntos de amostras de lapas, correspondendo a cada zona de produção, ou seja, um conjunto da zona L1, outro da L5a e outro da L7a. Foram realizadas análises aos microrganismos totais e aos contaminantes químicos, chumbo e cádmio, antes do tratamento térmico. Em cada conjunto, o tempo que as lapas sofreram este tratamento depende do tamanho destas, sendo que as lapas das zonas L1 e L5a tiveram 4 minutos sujeitas ao tratamento térmico, enquanto que as lapas da zona L7a tiveram 6 minutos. Para saber se o tratamento térmico estava a ser bem aplicado utilizou-se um termómetro para verificar a temperatura interna nas lapas. Realizado o tratamento térmico procedeu-se novamente às análises aos microrganismos totais e aos contaminantes químicos, chumbo e cádmio, sendo o resultado dos contaminantes químicos expresso em mg/kg

de peso fresco e o resultado dos contaminantes microbiológicos expresso em log UFC/g.

3.8. Análise estatística

Neste trabalho prático, recorreu-se ao *software* STATISTICA 7 para o tratamento dos dados. Para verificar a homogeneidade das variâncias dos contaminantes e da composição química nas épocas do ano e local de amostragem, realizou-se uma análise de variância a um fator (one-way ANOVA) e sempre que se constatou a existência de diferenças significativas entre os grupos em estudo. O nível de significância (p) fixou-se em 0,05 para todas as análises estatísticas.

4. Resultados e Discussão

4.1. Dados biométricos

Na Tabela 1 apresentam-se os valores obtidos relativamente aos dados biométricos (média \pm desvio padrão) das lapas que foram analisadas ao longo do estudo.

Tabela 1 – Dados biométricos (média \pm desvio padrão) das lapas analisadas ao longo do estudo.

Estação		Zona de produção		
		L1	L5a	L7a
Inverno (n=60)	Comprimento (cm)	3,6 \pm 0,3	3,1 \pm 0,2	4,3 \pm 0,3
	Largura (cm)	3,0 \pm 0,2	2,4 \pm 0,3	3,3 \pm 0,2
	Altura (cm)	1,5 \pm 0,3	1,3 \pm 0,2	1,4 \pm 0,3
	Parte edível (%)	43,8 \pm 5,7	37,2 \pm 6,4	36,9 \pm 5,0
Primavera (n=60)	Comprimento (cm)	3,4 \pm 0,2	3,7 \pm 0,2	4,1 \pm 0,4
	Largura (cm)	2,8 \pm 0,2	2,7 \pm 0,2	3,4 \pm 0,3
	Altura (cm)	1,3 \pm 0,2	1,4 \pm 0,2	1,3 \pm 0,3
	Parte edível (%)	42,4 \pm 6,3	41,8 \pm 5,6	34,2 \pm 5,6
Verão (n=60)	Comprimento (cm)	3,9 \pm 0,4	3,5 \pm 0,2	4,5 \pm 0,5
	Largura (cm)	3,0 \pm 0,3	2,5 \pm 0,2	3,5 \pm 0,4
	Altura (cm)	1,5 \pm 0,1	1,4 \pm 0,3	1,3 \pm 0,2
	Parte edível (%)	45,7 \pm 3,7	39,1 \pm 5,4	40,0 \pm 3,5

Analisando os dados da Tabela 1 pode verificar-se que os indivíduos que apresentam maior comprimento foram capturados na zona de produção de L7a, no entanto maior comprimento não parece contribuir para uma ter maior percentagem de parte edível. As maiores percentagens de parte edível encontraram-se na zona de produção L1, tendo atingido um máximo de 45,7 % no verão. Relativamente à zona de produção L5a verifica-se que tiveram uma maior percentagem de parte edível na primavera, cerca de 41,8 %.

A apanha deste univalves é muito pouco controlada em Portugal continental, uma vez que qualquer pessoa pode ir a uma zona costeira e encontrar estes moluscos de fácil acesso e capturá-los. No entanto na região autónoma do Açores, a apanha das lapas é controlada tendo um tamanho mínimo de captura para as duas espécies mais abundantes da região. Segundo o Diário da República nº. 178 de 1993, as lapas da

espécie *Patella aspera* têm que apresentar no mínimo 55 mm de comprimento, enquanto que as lapas da espécie *Patella candei* devem apresentar no mínimo 30 mm de comprimento, sendo que é tolerado a captura accidental de 10 % do número de indivíduos de tamanho inferior em 5 mm dos mínimos estipulados.

4.2. Contaminantes microbiológicos

4.2.1. Microrganismos totais

Na Tabela 2 apresentam-se as contagens (média \pm desvio padrão) de microrganismos totais em log UFC/g para lapas, de acordo com a zona de produção e a estação do ano.

Tabela 2 – Contagens (média \pm desvio padrão) de totais em log UFC/g para lapas, de acordo com a zona de produção e a estação do ano.

Estação	Zona de produção		
	L1	L5a	L7a
Inverno	5,63 \pm 0,22 ^{a,1}	5,97 \pm 0,12 ^{a,2}	7,21 \pm 0,03 ^{b,3}
Primavera	5,90 \pm 0,25 ^{a,b,1}	5,72 \pm 0,28 ^{a,1}	7,08 \pm 0,23 ^{b,2}
Verão	6,20 \pm 0,00 ^{b,1}	5,64 \pm 0,49 ^{a,1}	6,51 \pm 0,04 ^{a,1}

Em coluna, médias com letras minúsculas iguais indica que não há diferenças estatísticas entre as variáveis ($p < 0,05$). Em linha, médias com números iguais indica que não há diferenças estatísticas entre as variáveis ($p < 0,05$).

Observando os dados da Tabela 2 verifica-se que a zona L7a é que apresenta maior contaminação comparativamente as outras zonas de produção, apresentando valores compreendidos entre os 6,51 e os 7,21 log UFC/g, e a zona L5a é a que apresenta menor contaminação, como os valores a variar entre 5,64 e o 5,97 log UFC/g. As amostras colhidas no verão, provenientes das zonas L1 e L7a são estatisticamente diferentes das amostras colhidas no inverno e no inverno e no inverno/primavera provenientes respetivamente das zonas L1 e L7a. No entanto as amostras da zona L5a não diferem estatisticamente com a estação do ano.

Relativamente às três zonas de produção avaliadas, verifica-se que os teores de microrganismos viáveis totais registados no verão, para as três zonas de produção, não diferem estatisticamente. Contrariamente, as três zonas de produção apresentam níveis de contaminação estatisticamente diferentes umas das outras no inverno. Na primavera, os teores de contaminação das amostras provenientes da zona L7a são estatisticamente diferentes dos registados nas zonas L1 e L5a.

4.2.2. Coliformes e *Escherichia coli*

Relativamente aos coliformes, na Figura 6 apresenta-se as contagens médias de coliformes em log NMP/100g para lapas ao longo do estudo. Verifica-se que na primavera obteve-se a maior média, 2,63 log NMP/100g, destes microrganismos na zona L5a. Esta contagem separa-se um pouco das restantes desta zona, pois na primavera a temperatura da água aumenta colocando estes microrganismos em condições de multiplicação. Nas zonas L1 e L7a apresentam sempre contagens ao longo do estudo, sendo que as contagens na zona L1 apresenta-se entre 1,13 e 1,42 log NMP/100g e as contagens na zona L7a apresenta-se entre 1,30 e 2,52 log NMP/100g, esta zona apresenta uma gama de valores mais elevados pois a temperatura da água nesta zona é mais elevada que nas outras zonas.

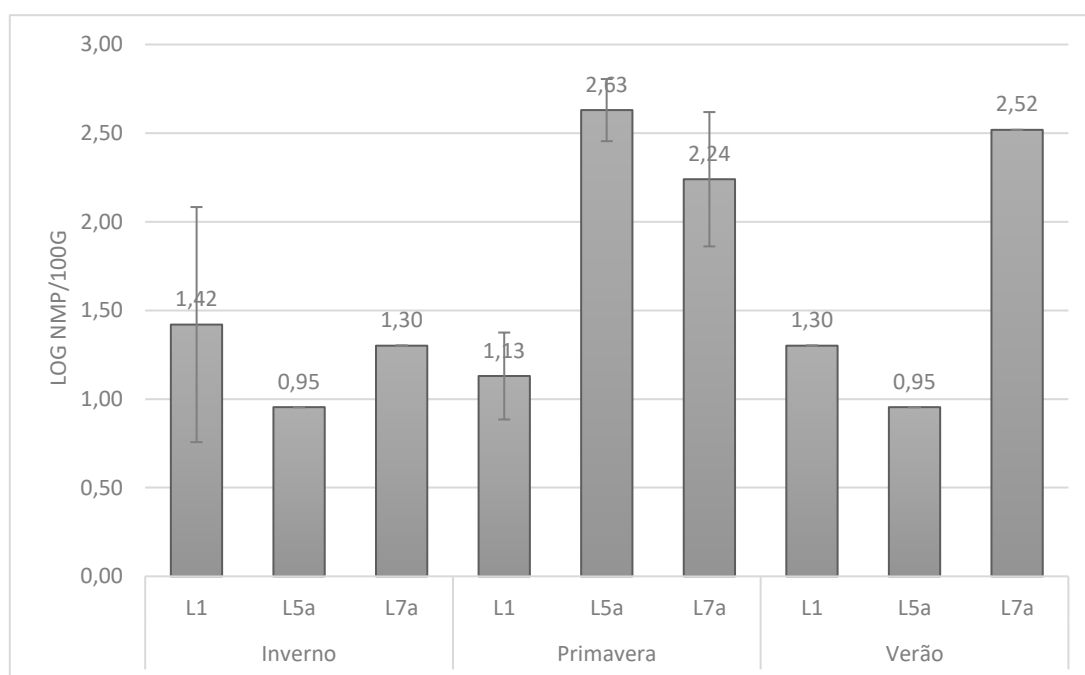


Figura 6 – Contagens (médias \pm desvio padrão) de coliformes em log NMP/100g para lapas durante o estudo.

Na Tabela 3 apresentam-se as contagens (média \pm desvio padrão) de *E. coli* em NMP/100g para lapas, de acordo com a zona de produção e a estação do ano.

Tabela 3 – Contagens (média \pm desvio padrão) de *E. coli* em log NMP/100g para lapas, de acordo com a zona de produção e a estação do ano.

Estação	Zona de produção		
	L1	L5a	L7a
Inverno	n.d	n.d	1,04 \pm 0,17
Primavera	n.d	n.d	1,13 \pm 0,20
Verão	n.d	n.d	n.d

n.d = não detetado.

Ao analisar os dados da Tabela 3 pode-se verificar nas zonas L1 e L5a que os valores de *E. coli* deram todos inferiores ao limite de deteção (<18 NMP/100g), enquanto que as amostras da zona L7a no inverno e na primavera evidenciaram contaminação de origem fecal, sendo que esta contaminação está muito abaixo do limite legal (700 NMP/100g, com 80 % dos resultados igual ou inferior a 230 NMP/100g) (UE, 2005).

Segundo dados obtidos pelo laboratório de microbiologia do IPMA em 2017, os valores para obtidos para *E. coli* para lapas são quase sempre não detetáveis, menos no mês de março para o local L5a que apresentou um valor de 1,65 log NMP/100g, sendo que este valor é superior ao obtido neste trabalho, uma vez que para o mesmo local não foi possível de detetar, no entanto, não ultrapassar o limite legal.

4.2.3. *Vibrio* spp

Relativamente a este contaminante microbiológico, verifica-se que a lapa só apresenta contagens num mês ao longo deste estudo, em que o valor médio foi de 550 UFC/g. O mês em que foi apresenta este valor o de fevereiro na zona de produção L7a. Esta contaminação pode ter ocorrido uma vez que esta zona de produção se situa no Algarve, a temperatura da água é mais elevada do que nas outras duas zonas de produção, e sendo que neste ano houve muitas alterações a nível das temperaturas climáticas.

Segundo o critério da ICMSF (1986), o limite máximo estabelecido para o *Vibrio parahaemolyticus* é numa amostra com dez unidades, apenas uma unidade pode apresentar um valor superior de 1000 UFC/g. Pode verificar-se para este trabalho, que

mesmo no mês em que houve maior contaminação por este microrganismo o valor médio não ultrapassou o limite máximo deste critério.

4.3. Contaminantes químicos

4.3.1. Mercúrio

Na Tabela 4 apresentam-se os resultados do teor de mercúrio (média \pm desvio padrão) em mg/kg para lapas, de acordo com a zona de produção e a estação do ano.

Tabela 4 – Teores de mercúrio (média \pm desvio padrão) em mg/kg para lapas, de acordo com a zona de produção e a estação do ano.

Estação	Zonas de produção		
	L1	L5a	L7a
Inverno	0,011 \pm 0,001 ^{a,1}	0,015 \pm 0,003 ²	< LQ
Primavera	0,012 \pm 0,001 ^{b,1}	< LQ	0,014 \pm 0,000 ²
Verão	< LQ	< LQ	< LQ

Em coluna, médias com letras minúsculas iguais indica que não há diferenças estatísticas entre as variáveis ($p < 0,05$). Em linha, médias com números iguais indica que não há diferenças estatísticas entre as variáveis ($p < 0,05$). LQ = 0,011 mg/kg.

Relativamente a este contaminante pode verificar-se, na Tabela 4, que alguns dos teores obtidos são inferiores ao limite de quantificação (LQ = 0,011 mg/kg), (por exemplo no verão nas três zonas de produção). Os resultados que são possíveis de quantificar apresentaram teores muito inferiores ao limite legal (0,50 mg/kg) (UE, 2006).

Estes teores são inferiores aos obtidos por Pérez *et al* (2019), em três espécies de lapas capturadas no “O Portiño” em Coruña, sendo estes teores entre 0,022 e 0,081 mg/kg ps para a espécie *P. vulgata*, de 0,033 e 0,099 mg/kg ps para a espécie *P. depressa* e de 0,025 e 0,056 mg/kg ps para a espécie *P. ullysiponensis*. Esta diferença de teores de mercúrio pode ser devido à zona de captura das lapas, uma vez que umas são da zona costeira, enquanto que outras são de uma zona portuária, onde a contaminação por metais é mais elevada devido à presença de barcos.

4.3.2. Cádmio

Na Tabela 5 apresentam-se os resultados do teor de cádmio (média \pm desvio padrão) em mg/kg para lapas, de acordo com a zona de produção e a estação do ano.

Tabela 5 – Teores de cádmio (média \pm desvio padrão) em mg/kg para lapas, de acordo com a zona de produção e a estação do ano.

Estação	Zonas de produção		
	L1	L5a	L7a
Inverno	1,2 \pm 0,1 ^{a,1}	2,8 \pm 0,5 ^{b,2}	2,3 \pm 1,0 ^{a,1,2}
Primavera	1,8 \pm 0,1 ^{c,1}	1,4 \pm 0,2 ^{a,1}	1,4 \pm 0,9 ^{a,1}
Verão	1,5 \pm 0,0 ^{b,1}	2,3 \pm 0,0 ^{a,b,2}	1,7 \pm 0,1 ^{a,1}

Em coluna, médias com letras minúsculas iguais indica que não há diferenças estatísticas entre as variáveis ($p < 0,05$). Em linha, médias com números iguais indica que não há diferenças estatísticas entre as variáveis ($p < 0,05$).

Dos dados da Tabela 5, pode verificar-se que todas as amostras ao longo do estudo apresentam teores superiores ao limite legal para este gastrópode (1,0 mg/kg) (UE, 2006). Relativamente às zonas de produção estudadas, constata-se que a zona que apresenta a gama de teores mais elevados é a L5a, entre 1,4 e 2,8 mg/kg, sendo assim a zona mais contaminada por este metal. Os teores obtidos nesta zona para o inverno e a primavera são estatisticamente diferentes, sendo que ambos não diferem estatisticamente do verão. Na zona L1, a gama de teores obtidos foi a mais baixa, entre 1,2 e 1,8 mg/kg, no entanto as diferentes estações diferem estatisticamente uma das outras. O mesmo não ocorre na zona L7a, em que os teores obtidos das diferentes estações não diferem estatisticamente entre si.

Relativamente à estação do ano, pode averiguar-se que na primavera os teores obtidos para as diferentes zonas não diferem estatisticamente entre si, enquanto que no verão as zonas L1 e L7a não diferem estatisticamente uma da outra, mas diferem da zona L5a. No inverno, a zona L1 diferem estatisticamente da zona L5a, mas ambas não apresentam diferenças estatísticas da zona L7a.

Um estudo efetuado por Cravos & Bebianno (2005) em lapas, da espécie *Patella aspera*, numa marina e num estuário do algarve, apresentou também teores elevados de cádmio, com um máximo de 9,19 mg/kg e um mínimo de 3,47 mg/kg para a zona da marina e um máximo de 2,55 mg/kg e um mínimo de 1,03 mg/kg para a zona do estuário. Estes teores obtidos na zona do estuário são relativamente semelhantes, aos encontrados no presente trabalho.

De acordo com a Organização para Alimentação e Agricultura/ Organização Mundial de Saúde (FAO/WHO, 2011) a dose mensal tolerável provisória (PTMI) para o cádmio é de 25 µg/kg peso corporal/mês. Tendo em conta o teor máximo encontrado no local L5a no inverno (2,8 mg/kg) e com base num consumo de 100 g de lapa e um peso corporal médio de um indivíduo de 70 kg, o PTMI será ultrapassado após 6 refeições deste molusco.

4.3.3. Chumbo

Na Tabela 6 apresentam-se os resultados do teor de chumbo (média ± desvio padrão) em mg/kg para lapas, de acordo com a zona de produção e a estação do ano.

Tabela 6 – Teores de chumbo (média ± desvio padrão) em mg/kg para lapas, de acordo com a zona de produção e a estação do ano.

Estação	Zonas de produção		
	L1	L5a	L7a
Inverno	0,43 ± 0,04 ^{a,3}	0,12 ± 0,02 ^{a,1}	0,34 ± 0,05 ^{a,2}
Primavera	0,37 ± 0,05 ^{a,2}	0,14 ± 0,01 ^{a,1}	0,32 ± 0,01 ^{a,2}
Verão	0,46 ± 0,01 ^{a,3}	0,14 ± 0,00 ^{a,1}	0,32 ± 0,01 ^{a,2}

Em coluna, médias com letras minúsculas iguais indica que não há diferenças estatísticas entre as variáveis ($p < 0,05$). Em linha, médias com números iguais indica que não há diferenças estatísticas entre as variáveis ($p < 0,05$).

Da Tabela 6, pode constatar-se que todos teores obtidos são inferiores do limite legal (1,5 mg/kg) (UE, 2006) para este metal. Relativamente as zonas, verifica-se que a zona L5a é que apresenta teores significativamente mais baixos, enquanto que a zona L1 é que apresenta teores significativamente mais elevados. Nenhuma das zonas diferem estatisticamente durante as três estações, mas as estações de inverno e verão apresentam resultados com diferenças estatísticas nas três zonas, enquanto que os teores na primavera das zonas L1 e L7a não apresentam diferenças estatísticas.

Os teores obtidos por Cravos & Bebianno (2005) em lapas, da espécie *Patella aspera*, numa marina e num estuário do algarve para este metal, são menores que 0,1 mg/kg, sendo por isso, inferiores aos obtidos neste trabalho. No entanto Pérez-López *et al* (2003), apresentou concentrações de chumbo entre 0,95 e 3 mg/kg, em lapas capturadas na Galiza, ou seja, teores mais elevados que os obtidos neste trabalho.

4.3.4. Arsénio

Relativamente ao arsénio, os níveis obtidos são sempre inferiores ao limite de quantificação do método, <0,5 mg/kg, ou seja, são inferiores ao critério utilizado pela Food Standards Australia New Zealand (2019), em que o limite para este contaminante é de 1 mg/kg de peso fresco.

No entanto num estudo realizado por Pérez *et al* (2019), em três espécies de lapas capturadas no “O Portiño” em Coruña, os teores obtidos para este metal foram rondaram os 10,7 – 17,9 mg/kg ps para espécie *P. vulgata*, 11,9 – 17,6 mg/kg ps para a espécie *P. depressa* e 10,1 – 17,1 mg/kg ps para a espécie *P. ullysiponensis*.

4.3.5. Níquel

Na Tabela 7 apresentam-se os resultados do teor de níquel (média \pm desvio padrão) em mg/kg para lapas, de acordo com a zona de produção e a estação do ano.

Tabela 7 – Teores de níquel (média \pm desvio padrão) em mg/kg para lapas, de acordo com a zona de produção e a estação do ano.

Estação	Zona de produção		
	L1	L5a	L7a
Inverno	0,27 \pm 0,05 ^{a,1}	0,44 \pm 0,23 ^{a,1}	0,50 \pm 0,27 ^{a,1}
Primavera	0,55 \pm 0,03 ^{b,1}	1,37 \pm 0,09 ^{b,2}	0,66 \pm 0,00 ^{a,1}
Verão	0,32 \pm 0,01 ^{a,2}	0,26 \pm 0,01 ^{a,1}	0,24 \pm 0,01 ^{a,1}

Em coluna, médias com letras minúsculas iguais indica que não há diferenças estatísticas entre as variáveis ($p < 0,05$). Em linha, médias com números iguais indica que não há diferenças estatísticas entre as variáveis ($p < 0,05$).

Dos dados da Tabela 7, pode verificar-se que nas zonas de produção L1 e L5a, a primavera apresenta difere estatisticamente das outras estações. Relativamente à zona de produção L7a, verifica-se que não existem diferenças significativas entre as estações. É na estação primavera que apresenta os maiores teores para este elemento, sendo que nesta estação a zona de produção L5a é estatisticamente diferente das outras duas zonas de produção. Em relação as outras estações, verifica-se que no inverno não existem diferenças significativas para as zonas de produção, enquanto que no verão, a zona de produção L1 diferem estatisticamente das restantes zonas de produção.

Segundo um estudo efetuado por Cravos & Bebianno (2005) em lapas, da espécie *Patella aspera*, numa marina e num estuário do algarve, os teores de níquel apresentados foram superiores, entre 1,82 e 7,19 mg/kg para a zona da marina e 2,86 e 11,3 mg/kg para a zona do estuário, aos obtidos neste trabalho.

4.3.6. Crómio

Na Tabela 8 apresentam-se os resultados do teor de crómio (média \pm desvio padrão) em mg/kg para lapas, de acordo com a zona de produção e a estação do ano.

Tabela 8 – Teores de crómio (média \pm desvio padrão) em mg/kg para lapas, de acordo com a zona de produção e a estação do ano.

Estação	Zona de produção		
	L1	L5a	L7a
Inverno	0,24 \pm 0,02 ^{a,1}	0,47 \pm 0,24 ^{a,1}	0,50 \pm 0,29 ^{a,1}
Primavera	0,33 \pm 0,01 ^{b,1}	1,67 \pm 0,21 ^{b,2}	0,79 \pm 0,00 ^{a,1}
Verão	0,42 \pm 0,01 ^{c,3}	0,28 \pm 0,00 ^{a,2}	0,23 \pm 0,00 ^{a,1}

Em coluna, médias com letras minúsculas iguais indica que não há diferenças estatísticas entre as variáveis ($p < 0,05$). Em linha, médias com números iguais indica que não há diferenças estatísticas entre as variáveis ($p < 0,05$).

Da Tabela 8, pode constatar-se que a zona de produção L5a é que apresenta o teor máximo deste elemento. Nesta zona, a primavera apresenta diferenças significativas em relação as outras zonas de produção. No entanto, a zona de produção L7a não apresenta diferenças estatísticas entre as estações, enquanto que a zona de produção L1 apresenta diferenças estatísticas entre todas as estações. Relativamente à estação inverno, verifica-se que não existe diferenças significativas para as três zonas de produção, enquanto que no verão, as três zonas de produção diferem estatisticamente entre si. Em relação à primavera, verifica-se que a zona de produção L5a apresenta diferenças significativas das outras zonas de produção.

4.3.7. Comparação entre as duas espécies

Na Tabela 9 apresentam-se os resultados dos teores de contaminantes (média \pm desvio padrão) das duas espécies estudadas.

Tabela 9 – Teores de contaminantes (média \pm desvio padrão) das duas espécies estudadas.

Contaminantes	Espécie	
	Lapa	Mexilhão
Totais (log UFC/g)	6,22 \pm 0,64 ^b	5,33 \pm 0,86 ^a
<i>E. coli</i> (log NMP/100g)	0,99 \pm 0,11 ^a	1,25 \pm 0,43 ^b
Mercúrio (mg/kg)	0,012 \pm 0,002 ^a	0,017 \pm 0,007 ^b
Cádmio (mg/kg)	1,8 \pm 0,7 ^b	0,3 \pm 0,1 ^a
Chumbo (mg/kg)	0,29 \pm 0,12 ^b	0,15 \pm 0,05 ^a
Níquel (mg/kg)	0,62 \pm 0,42 ^b	0,36 \pm 0,12 ^a
Crómio (mg/kg)	0,69 \pm 0,54 ^b	0,39 \pm 0,13 ^a

Em linha, médias com letras minúsculas iguais indica que não há diferenças estatísticas entre as variáveis ($p < 0,05$).

Analisando a Tabela 9, pode verificar-se que as duas espécies diferem estatisticamente em todos os contaminantes analisados. Relativamente aos contaminantes microbiológicos, constata-se que a lapa apresenta uma contaminação por microrganismos totais maior do que o mexilhão, enquanto que em relação à *E. coli* os resultados invertem-se. Como o mexilhão é um molusco bivalve filtrador concentra os microrganismos presentes na coluna de água, tendo sido registados teores mais elevados de *E. coli* (de origem fecal) do que na lapa. Apesar da lapa ser um molusco univalve não filtrador apresentou teores mais elevados de microrganismos totais eventualmente de origem marinha e associados as algas existentes no seu habitat.

Relativamente aos contaminantes químicos, verifica-se que a lapa apresenta níveis mais elevados que o mexilhão. O contaminante que apresenta maior preocupação é o cádmio, uma vez que o seu valor está acima do limite legal, como já foi referido acima. Uma explicação para estes resultados é que a lapa se alimenta do substrato rochoso onde habita, podendo concentrar os metais que constituem a rocha.

Segundo um estudo efetuado por Pérez *et al* (2019), para os contaminantes químicos presentes em lapa e mexilhão capturados no “O Portiño” em Coruña, verifica-se que os níveis destes contaminantes são superiores aos obtidos neste trabalho, sendo que os teores de mercúrio variam entre 0,039 e 0,133 mg/kg ps para o mexilhão e entre 0,022 e 0,099 mg/kg ps para a lapa, os teores cádmio variam entre 0,606 e 1,61 mg/kg

ps para o mexilhão e entre 1,31 e 7,61 mg/kg ps para a lapa, os teores de chumbo variam entre 0,679 e 2,18 mg/kg ps para o mexilhão e entre 0,677 e 2,75 mg/kg ps para a lapa, os teores de níquel variam entre 1,65 e 4,47 mg/kg ps para o mexilhão e entre 0,82 e 7,16 mg/kg ps para a lapa e os teores de crómio variam entre 3,61 e 8,98 mg/kg ps para o mexilhão e entre 0,81 e 7,77 mg/kg ps para a lapa.

Na Figura 7, estão representadas as percentagens de amostras positivas e negativas quanto à presença de *Vibrio* spp para as duas espécies. Pode-se verificar que o mexilhão apresentou uma percentagem de amostras positivas muito superior, cerca de 80 %, comparativamente à lapa, cerca de 47 %. Como já foi referido em cima, o mexilhão é um molusco filtrador conseguindo concentrar este microrganismo dentro do seu organismo durante o período de alimentação.

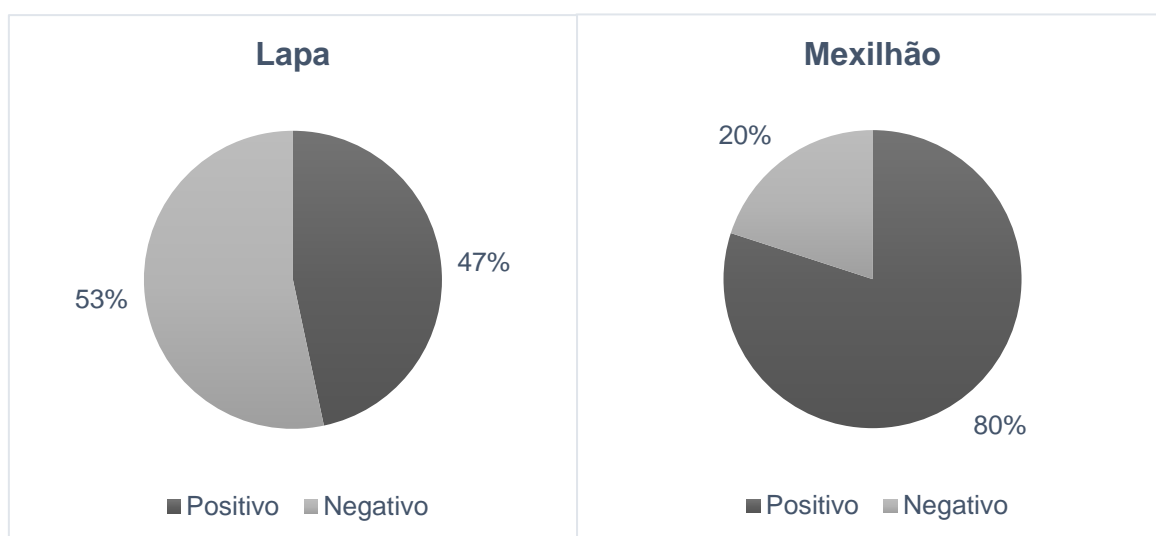


Figura 7 – Percentagem amostras positivas e negativas quanto à presença de *Vibrio* spp nas duas espécies ao longo do estudo.

4.4. Composição nutricional

Na Tabela 10, apresentam-se os resultados obtidos para a composição química (média \pm desvio padrão) em g/100 g da lapa nas estações do ano inverno e verão.

Tabela 10 – Composição química (média \pm desvio padrão) em g/100 g da lapa.

Composição química	Estação	
	Inverno	Verão
Humidade	83,2 \pm 1,2 ^b	78,7 \pm 1,8 ^a
Gordura	<LQ	1,1 \pm 0,6
Cinza	4,07 \pm 0,17 ^a	3,76 \pm 0,63 ^a
Proteína	10,7 \pm 1,4 ^a	13,6 \pm 1,0 ^b
Glicogénio	0,18 \pm 0,08 ^a	0,16 \pm 0,03 ^a

Em linha, médias com letras minúsculas iguais indica que não há diferenças estatísticas entre as variáveis ($p < 0,05$; LQ = 0,3 g/100 g)).

A lapa apresenta níveis de humidade entre os 78,7 e os 83,2 g/100 g. Como se pode constatar, existem diferenças significativas entre as duas estações do ano, ou seja, as lapas do inverno diferem significativamente das lapas do verão. Relativamente ao teor de gordura, não foi possível de quantificar no inverno (LQ = 0,3 g/100 g), no entanto foi possível quantificar no verão, sendo de cerca 1,1 g/100 g. No que se refere ao teor de cinza, não existem diferenças significativas em relação às estações do ano, apresentando teores entre 3 e 4 g/100 g. Em relação ao teor de proteína, existem diferenças significativas em relação à sazonalidade, em que o teor mais elevado de proteína se encontra no verão, cerca de 13,6 g/100 g. No que diz respeito ao teor de glicogénio, não existem diferenças significativas em relação à sazonalidade, apresentando um teor de cerca 0,2 g/100 g. Estas diferenças pode ser devido à fisiologia da lapa, uma vez que no verão as lapas encontram-se na época de reprodução, o que estimula a uma maior alimentação.

Relativamente aos valores obtidos para a composição química, num estudo efetuado por Rambli *et al* (2016), numa zona de produção diferente e com a espécie de lapa *P. vulgata*, esta apresentou valores de humidade e proteína semelhantes, cerca de 77,3 g/100 g para a humidade e 13,0 g/100 g para a proteína, enquanto que para gordura, os valores foram um pouco acima, cerca de 2,3 g/100 g, no entanto para a cinza, os valores foram abaixo, cerca de 2,4 g/100 g.

Num outro estudo efetuado por Fernandes *et al* (2019) em lapas do arquipélago da Madeira, revela que as lapas apresentam cerca de (7,71 - 12,60 %, ps) de lípidos, (48,22 - 64,09 %, ps) de proteínas, (11,12 - 23,12 %, ps) de cinza e (4,5 - 10,9 %, ps) de hidratos de carbono. Mesmo convertendo estes teores para peso húmido, os macronutrientes apresentam níveis mais concentrados comparativamente aos que foram obtidos neste trabalho. Este facto pode ser devido ao local de captura e à época de desova (Cúrdia *et al*, 2005).

Comparando com outras espécies de moluscos, por exemplo da amêijoia boa, que apresenta um teor de proteína de 11,7 g/100 g e um teor de cinza de 1,0 g/100 g, verifica-se que a lapa apresenta um teor de proteína e de cinza mais elevado que esta (IPMA,2018b)

Na Tabela 11, apresenta-se a composição em elementos essenciais (média \pm desvio padrão) em mg/kg das lapas.

Tabela 11 – Composição em elementos essenciais (média \pm desvio padrão) em mg/kg das lapas.

Elementos essenciais	Estação	
	Inverno	Verão
P (mg/kg)	801 \pm 114 ^a	1282 \pm 53 ^b
Cu (mg/kg)	1,97 \pm 1,53 ^a	0,70 \pm 0,07 ^a
Zn (mg/kg)	10,5 \pm 2,9 ^a	9,7 \pm 1,7 ^a
Fe (mg/kg)	151,2 \pm 83,6 ^a	269,4 \pm 117,9 ^a
Mn (mg/kg)	3,8 \pm 2,2 ^a	3,0 \pm 1,7 ^a
Mg (mg/kg)	1065 \pm 148 ^b	837 \pm 69 ^a
K (mg/kg)	1902 \pm 95 ^a	2047 \pm 137 ^a
Na (mg/kg)	4616 \pm 307 ^b	3788 \pm 126 ^a

Em linha, médias com letras minúsculas iguais indica que não há diferenças estatísticas entre as variáveis ($p < 0,05$).

De acordo com os dados da Tabela 11, verifica-se que os elementos essenciais na lapa apresentam o perfil Na>K>Mg \cong P>Fe>Zn>Mn>Cu. Comparando os valores obtidos para as duas estações, verifica-se que apenas os teores de P, Mg e Na apresentaram diferenças significativas, no entanto, o máximo do fósforo foi obtido no verão enquanto que para o Na e Mg foram obtidos no inverno.

Este perfil é semelhante ao encontrado por outras espécies de moluscos (Lourenço, 2009). No entanto, atendendo aos teores obtidos por Cravos & Bebianno (2005), em lapas, para o Fe, um máximo de 2152 mg/kg e um mínimo de 393 mg/kg ,

para o Mn, um máximo de 22,4 mg/kg e um mínimo de 3,91 mg/kg, para o Zn, um máximo de 114 mg/kg e um mínimo de 36,1 mg/kg e para o Cu, um máximo de 9,19 mg/kg e um mínimo de 3,54 mg/kg, verifica-se que são muito superiores aos apresentados neste trabalho. Esta diferença pode ser explicada pela zona de captura das lapas, uma vez que no estudo de Cravos & Bebianno (2005) as lapas são provenientes de uma marina e de um estuário, e pela época de captura.

4.5. Tratamento térmico

Na Tabela 12 apresentam-se os teores dos principais contaminantes (média \pm desvio padrão) das lapas, antes e depois do tratamento térmico.

Tabela 12 - Teores dos principais contaminantes (média \pm desvio padrão) das lapas, antes e depois do tratamento térmico.

Estado	Contaminantes		
	Chumbo (mg/kg)	Cádmio (mg/kg)	Totais (log UFC/g)
Cru	0,18 \pm 0,10 ^a	1,3 \pm 0,4 ^a	5,31 \pm 1,20 ^b
Grelhado	0,75 \pm 0,24 ^b	2,4 \pm 1,2 ^a	0,50 \pm 1,00 ^a

Em coluna, médias com letras minúsculas iguais indica que não há diferenças estatísticas entre as variáveis ($p < 0,05$).

Observando os dados da Tabela 12, pode averiguar-se que a nível microbiológico, houve uma redução significativa dos microrganismos totais com o tratamento térmico. Relativamente aos contaminantes químicos, verifica-se um aumento da concentração destes, uma vez que com o tratamento térmico existe uma redução do teor de água na lapa. Com isto, os valores de cádmio são os que relevam alguma preocupação já antes do tratamento se apresentavam superiores ao limite legal para este gastrópode (UE, 2006), embora não exista nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os valores observados nas lapas cruas e grelhadas. Em relação ao chumbo, verifica-se que existem diferenças significativas entre os valores registados na lapa crua e grelhada. Adicionalmente estes valores encontram-se abaixo do limite legal (UE, 2006).

5. Conclusões

Dos contaminantes microbiológicos analisados na lapa, pode verificar-se quanto à *E.coli* que os valores apresentados foram sempre valores inferiores ao limite de deteção para as zonas de produção L1 e L5a, e para a zona L7a apresentou valores possíveis de detetar mas sempre inferiores ao limite legal, por isso é notável que não existam indícios de contaminação fecal neste univalve. Relativamente aos outros contaminantes microbiológicos (microrganismos viáveis totais, coliformes e *Vibrio* spp) os valores obtidos foram sempre inferiores ao limite legal nas três zonas de produção.

Dos teores dos contaminantes químicos na lapa, pode concluir-se que o cádmio é o único que apresenta teores superiores ao limite legal, o que causa alguma preocupação ao nível da saúde pública, uma vez que este univalve é capturado de forma recreacional em Portugal continental e a dose mensal deste metal não deverá ser superior a 25 µg/kg peso corporal/mês, ou seja, um adulto com cerca de 70 kg, se consumir 100 g de lapa onde se obteve pior resultado, 2,8 mg/kg na zona L5a, não pode exceder as 6 refeições por mês.

Em relação à comparação entre as duas espécies, pode concluir-se que os teores observados para os contaminantes avaliados foram significativamente diferentes. Verificou-se também que o mexilhão concentra os contaminantes presentes na água enquanto que a lapa concentra os contaminantes presentes na superfície rochosa, onde habita.

Relativamente à composição química da lapa, esta apresenta ser uma boa fonte de proteína entre 10 e 14 g/100 g, dependendo da época em que é capturada, apresenta também uma quantidade de cinza interessante, 4 g/100 g, o que demonstra um teor de proteína e de cinza superior a outras espécies de moluscos.

O conteúdo de elementos essenciais na lapa apresenta a seguinte sequência decrescente Na>K>Mg≅P>Fe>Zn>Mn>Cu. Este perfil é semelhante para outras espécies de moluscos. Tendo em conta a estação do ano os teores destes elementos variam, principalmente os valores de Mg e P.

O tratamento térmico na lapa revelou-se positivo para os contaminantes microbiológicos (microrganismos totais), ou seja, houve uma redução do teor de microrganismos, e revelou-se negativo para os contaminantes químicos (chumbo e cádmio), uma vez que com a libertação de água durante o tratamento térmico, o teor

destes contaminantes químicos apresentou um aumento, ou seja, uma maior concentração destes na lapa, devido à perda de água.

Referências Bibliográficas

- Brazão, S, Morais, S, Boaventura, D, Ré, P, Narciso, L & Hawkins, S. (2003). Spatial and temporal variation of the fatty acid composition of *Patella* spp. (Gastropoda: Prosobranchia) soft bodies and gonads. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 136, 425-441p.
- CEN. (2003). European standard EN 14084: Foodstuffs - Determination of trace elements - Determination of lead, cadmium, zinc, copper and iron by atomic absorption spectrometry (AAS) after microwave digestion. Brussels.
- Cravos, A. & Bebianno, M.J. (2005). Bioaccumulation of metals in the soft tissue of *Patella aspera*: Application of metal/shell weight indices. Centre of Marine and Environmental Research (CIMA), FCMA, University of Algarve, Campus de Gambelas, Faro, Portugal.
- Cunha, V. (2012). Redução do teor de contaminantes químicos em bivalves provenientes do estuário do Tejo. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. 72.
- Cúrdia, J. Santos Rodrigues, A. Martins, A.M.F. Costa, M.J. (2005). The reproductive cycle of *Patella candei gomesii* Drouët, 1858 (Mollusca: Patellogastropoda), an Azorean endemic subspecies. *Invertebrate Reproduction and Development*, 48, 137-145p.
- DePaola. A & Toyofuku. H. (2014). *Safety of food and beverages*, 3, 260–267p.
- DIÁRIO DA REPÚBLICA – I SÉRIE-B Nº 178 de 31 de julho de 1993 relativo à apanha de lapas em todas as ilhas e ilhéus dos Açores.
- EMEPC (2016). Guia Técnico do Curso de identificação das espécies de moluscos não indígenas da costa portuguesa. Estrutura de Missão para a Extensão da Plataforma Continental, 222p.
- Enes, M. (2015). Desenvolvimento do método de índice de qualidade (“QIM – Quality Index Method”) para as lapas (*Patella candei* e *Patella aspera*) e estudo das suas condições de transporte. Dissertação de Mestrado Estudo Integrado dos Oceanos, Universidade dos Açores. 61p.

- EPA. (1997). Mercury Study Report to Congress. Volume III: Fate and Transport of Mercury in the Environment. Environment Protection Agency, Estados Unidos da América, 376p.
- EPA. (2007). Test method 7473: Mercury in solids and solutions by thermal decomposition, amalgamation and atomic absorption spectrophotometry. USA.
- Lee, R., Lovatelli, A., Ababouch, L. Bivalve depuration: fundamental and practical aspects. FAO Fisheries Technical Paper. No.511. Rome, FAO. 2008. 139p.
- FAO/WHO. (2011). Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Seventy-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). WHO FOOD ADDITIVES SERIES: 64, 551p.
- Fernandes, I., Fernandes, T., Cordeiro, N. (2019). Nutritional value and fatty acid profile of two wild edible limpets from the Madeira Archipelago. *European Food Research and Technology*, 245(4), p895–905.
- Food and Drug Administration (FDA). (2012). Bad bug book: Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. *Bad Bug Book: Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*, 292p.
- Food Standards Australia New Zealand. (2019). <http://www.foodstandards.gov.au/consumer/chemicals/arsenic/Pages/default.aspx>, consultado em 25/7/2019.
- Gaudêncio, M.J & Guerra, M.T. (1986). Aspects of the ecology of *Patella* spp, on the portuguese coast. *Hydrobiologia*, 69, 57-69p.
- Henriques, P, Delgado, J e Sousa, R (2017). Patellid limpets: an overview of the biology and conservation of keystone species of the rocky shores. *In* Ray, S (ed.), *Organismal and Molecular Malacology*. Croatia:IntechOpen, pp. 71–95p.
- INE. (2019). Estatísticas da Pesca 2018. (Instituto Nacional de Estatística, editor.). Lisboa.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). (1986). *Microorganisms in Foods 2. Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications*. 2nd Ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 293p.

- IPMA. (2018a). Pescas e aquacultura. Doc. e Legis. Available from: https://www.ipma.pt/resources.www/docs/publicacoes.site/pescado/site/introducao/introd_all.htm.
- IPMA. (2018b). Pescas e aquacultura. Doc. e Legis. Available from: https://www.ipma.pt/resources.www/docs/publicacoes.site/pescado/site/ameijoa/ameij_all.htm.
- IPQ. (2009a). NP 2282 - Produtos da pesca e da aquicultura: Determinação da humidade. Caparica.
- IPQ. (2009b). NP 2032 - Produtos da pesca e da aquicultura: Determinação do teor de cinza total. Caparica.
- IPQ. (2009c). NP 1972 - Produtos da pesca e da aquicultura: Determinação do teor de matéria gorda livre. Caparica.
- ISO 13730. (1996). Meat and meat products - Determination of total phosphorus content- Spectrometric method.
- ISO 16649-3. (2015). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs - Enumeration of b-glucuronidase Positive Escherichia coli - Part 3: Most Probable Number Technique Using 5- bromo-4-chloro-3-indolyl-b-Dglucuronide Acid. Genebra.
- ISO 21872-1. (2017). Microbiology of the food chain – Horizontal method for the determination of Vibrio spp – Part 1: Detection of potentially enteropathogenic Vibrio parahaemolyticus, Vibrio cholerae and Vibrio vulnificus. Genebra.
- ISO 4833-2. (2013). Preview Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 2: Colony count at 30 degrees C by the surface plating technique. Genebra.
- ISO 6887-3. (2017). Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products. Genebra.
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., & Beeregowda, K. N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. Interdiscip Toxicol, Vol. 7(2): 60–72p.

- Jones, D. B. 1941. Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins. United States Dep. Agric.
- Jorhem, L. (2000). Determination of metals in food by atomic absorption spectrometry after dry ashing: NMKL Collaborative study. J. AOAC Int. 83: 1204–1211p.
- Kirsten, W.J, and Hesselius. G. U. (1983). Rapid, Automatic, High Capacity of Nitrogen Dumas Determination. Microchem. J. 547: 529-547p.
- Lourenço, M. Cardoso, C. Afonso, C. (2012). Avaliação de riscos de contaminantes químicos inorgânicos em pescado. Riscos e Alimentos. 7-11p.
- Lourenço, M (2011). Essential and toxic elements in fish products consumed in Portugal. Tese de Doutoramento em Bioquímica, Universidade de Lisboa, 79p.
- Morais, S, Boaventura, D, Narciso, L, Ré, P & Hawkins, S. (2003). Gonad development and fatty acid composition of *Patella depressa* Pennant (Gastropoda: Prosobranchia) populations with different patterns of spatial distribution, in exposed and sheltered sites. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 294, 61-80p.
- Moreira, I. N., Mourato, M. P., Reis, R., Martins, L. L. (2015). Oxidative stress induced by cadmium and copper in *Brassica rapa* leaves: indicators of stress, oxidative damage and antioxidant mechanisms. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 46(19), 2475-2489p.
- Moreira, L. (2008). *Mytilus edulis* E *Mytilus galloprovincialis*: características e aquicultura. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Toxicologia e Ecotoxicologia, Universidade de Aveiro, Aveiro. 53p.
- Oliveira, J., Cunha, A., Castilho, F., Romalde, J. L., & Pereira, M. J. (2011). Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives - A mini-review. Food Control, 22(6), 805–816p.
- Oliveira, M. (2012). Moluscos bivalves em Portugal: Composição química e metais contaminantes. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar. Universidade Nova de Lisboa, 65p.

- Oliveira, V. (2018). Segurança sanitária dos moluscos bivalves vivos produzidos em zonas estuarinas portuguesas e respetivo controlo oficial. Dissertação de mestrado em Segurança Alimentar. Universidade de Lisboa, 67p.
- Pedro, S & Silva, H. (2012). Contaminação microbiana em moluscos bivalves. Riscos e Alimentos, 12-15p.
- Pérez, S. Sánchez-Marín, P. Bellas, J. Viñas, L. Besada, V. Fernández, N. (2019). Limpets (*Patella* spp. Mollusca, Gastropoda) as model organisms for biomonitoring environmental quality. *Ecological Indicators* 101, 150-162p.
- Pérez-López, M. Alonso, J. Nóvoa-Valiñas, C. Melgas, M.J. (2003). Assessment of Heavy Metal Contamination of Seawater and Marine Limpet, *Patella vulgata* L., from Northwest Spain. *JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND HEALTH Part A—Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*. Vol. A38, No. 12, 2845–2856p.
- Pinto, J & Neves, R. (2010). HACCP - Análise de Riscos no Processamento Alimentar. 2ª Edição, Publindústria, Edições Técnicas, Porto, 177p.
- Rambli, M. Badii, F. Yousr, M. Howell, N. (2016). Nutritional and rheological properties of underutilised shellfish (mollusc), Limpet (*Patella Vulgata*). University of Surrey, Faculty of Health and Medical Sciences, School of Biosciences and Medicine, Guildford, Surrey, UK.
- Rodrigues, S. (2015). Elaboração de paté de lapa, *Patella* spp., com adição de medronho, *Arbutus unedo*: caracterização físico-química, microbiológica e sensorial e avaliação da estabilidade oxidativa. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar, Instituto Politécnico de Leiria, Leiria. 76p.
- Rodrigues, S. (2015). Elaboração de paté de lapa, *Patella* spp., com adição de medronho, *Arbutus unedo*: caracterização físico-química, microbiológica e sensorial e avaliação da estabilidade oxidativa. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar, Instituto Politécnico de Leiria, Leiria. 76p.
- Silva, H & Batista, I. (2008). Produção, salubridade e comercialização dos moluscos bivalves em Portugal, Publicações avulsas do IPIMAR 20, 171p.

- UE. (2004). REGULAMENTO (CE) Nº 853/2004 de 29 de Abril de 2004 relativo a regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal.
- UE. (2005). REGULAMENTO (CE) Nº 2073/2005 de 15 de novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios.
- UE. (2006). REGULAMENTO (CE) Nº 1881/2006 de 19 de dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios.
- UE. (2010). REGULAMENTO (UE) N.º 558/2010 de 24 de junho de 2010 que altera o anexo III do Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal.
- UE. (2015). REGULAMENTO (UE) 2015/2285 DA COMISSÃO de 8 de dezembro de 2015 que altera o anexo II do Regulamento (CE) Nº 854/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho.
- Viles, F. J., and L. Silverman. (1949). Determination of Starch and Cellulose with Anthrone. Anal. Chem. 950–953p.

Anexos

Anexo 1 – Comunicação apresentada no
3rd International Conference on Food
Contaminants - Challenges in Risk
Assessment, 26-27 September 2019, Aveiro,
Portugal

Caetano, J.^{1,2}; Pedro, S.¹, Gonçalves, S.¹, Martins, M. F.¹, Mourato, M.², Lourenço, H. M.¹

¹Sea and Marine Resources Department/ Aquaculture and Upgrading (DMRM/DivAV), Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA, I.P.), Rua Alfredo Magalhães Ramalho, 1495-006 Lisboa, Portugal

²LEAF – Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food, Instituto Superior de Agronomia (ISA), Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal.

Aim of the study

Evaluation of microbiology and the contamination by metals in limpets (*Patella* spp.), from three coastal zones of national territory.



Material and methods

All marine gastropods examined in this study were collected between February 2019 and July 2019 from three Portuguese coastal production areas (PA), namely L1, L5a and L7a (Fig 1), in the aim of National Bivalve Mollusc PA Monitoring System (SNMB), under IPMA responsibility. Mercury (Hg) was performed by atomic absorption spectrometry based on the standard EPA methodology (EPA, 2007). Cadmium (Cd) and lead (Pb) were determined by graphite furnace atomic absorption spectrometry using the methodology indicated on NP EN 14084 (2003). *Escherichia coli* was determined by most probable number (MPN) in live species (ISO 16649-3:2015), with samples prepared according to ISO 6887-3 (2017).



Figura 1 – Location of sample production areas (PA)

Results

All *E. coli* results from L1 and L5a production areas were below the detection limit (< 18 MPN/100g) (Table 1). Winter and spring samples from L7a production area, located in SW of Portugal, revealed some contamination of faecal origin, but were always below the legal limits (Table 2).

Table 1 – Faecal contamination levels in limpets. Results are expressed as mean ± standard deviation.

PA	Season		
	Winter	Spring	Summer
<i>E. coli</i> (Log MPN/100g)			
L1	n.d	n.d	n.d
L5a	n.d	n.d	n.d
L7a	1.04 ± 0.17	1.13 ± 0.20	n.d

n.d – not detected.

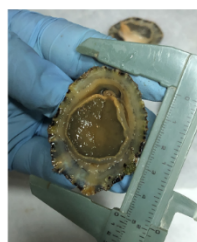


Table 2 – Legal limits.

Cd	1.0 mg/kg
Pb	1.5 mg/kg
Hg	0.50 mg/kg
<i>E. coli</i>	700 MPN/100g, with 80% results ≤ 230 MPN/100g



Table 3 presents the results for contaminant metals in limpets from different production areas. Contents of Hg and Pb from the three areas studied, over several months, were always below the limits of 0.50 mg/kg and 1.5 mg/kg allowed by the EU (2006), respectively (Table 2). However, limpets from L5a presented Pb levels inferior to those from the other areas, being statistically different in winter and spring. Regarding Cd levels these were always above the limit of 1.0 mg/kg, reaching about 3.0 mg/kg in L5a samples from winter. In spite of spring samples did not show significant differences among PA, L5a samples from winter and summer were statistically different of L1 samples. These differences probably suggest correlation between season and animal condition. It should be noted that due to these high Cd values, capture of these species has been forbidden, in the aim of SNMB, under IPMA responsibility.

Table 3 – Metals contamination levels in limpets. Results are expressed in mg/kg, ww (mean ± standard deviation).

PA	Season					
	Cd	Winter Hg	Pb	Cd	Spring Hg	Pb
L1	1.2 ± 0.1 ^a	< LoQ	0.43 ± 0.04 ^b	1.8 ± 0.1 ^a	0.012 ± 0.001	0.37 ± 0.05 ^b
L5a	2.8 ± 0.5 ^b	0.015 ± 0.002	0.12 ± 0.02 ^a	1.4 ± 0.2 ^a	< LoQ	0.14 ± 0.01 ^a
L7a	2.3 ± 1.0 ^{a,b}	< LoQ	0.34 ± 0.05 ^c	1.4 ± 0.9 ^a	0.014 ± 0.000	0.32 ± 0.01 ^b

LoQ – Limit of quantification (0.011 mg/kg).



Conclusion

Microbiological results support EU legislation which excluded limpets from PA classification rules. Since in Portugal there is a recreational harvest, it is warned that in consumption of 100g of limpets for a 10 kg child, Cd level will be higher than the PTMI (25 µg/kg, bw/month) established by FAO / WHO (2011). For an adult (70 kg) consumption should not exceed about 5 meals per month, particularly on the coast Peniche - Cabo Raso (L5a).

References

- EPA (2007). Test method 7473: Mercury in solids and solutions by thermal decomposition, amalgamation and atomic absorption spectrometry. SW-846, USA, Environment Protection Agency, 17p.
- EU (2006). Commission Regulation (EC) No 1831/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, JO, L364, S-24.
- FAO/WHO (2011). Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Seventy-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). WHO FOOD ADDITIVES SERIES: 64, 551p.
- ISO 16649-3 (2015). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Enumeration of β -glucuronidase Positive *Escherichia coli* – Part 3: Most Probable Number Technique Using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide Acid, 10p.
- ISO 6887-3 (2017). Microbiology of the food chain – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products, 16p.
- NP EN 14084 (2003). Foodstuffs – Determination of trace elements – Determination of lead, cadmium, zinc, copper and iron by atomic absorption spectrometry (AAS) after microwave digestion, CEN, Brussels, 16p.



Acknowledgments
Authors acknowledge project MAR2020 "SNMB-Monitor: National Monitoring System for Bivalve Molluscs" for funding of this work.